

AL

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Oktober 2001 (25.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/79216 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07H (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/04030
- (22) Internationales Anmeldedatum:
7. April 2001 (07.04.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 19 135.5 18. April 2000 (18.04.2000) DE
- (71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt (DE).
- Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- (72) Erfinder: UHLMANN, Eugen; Zum Talblick 31, 61479 Glashütten (DE). BREIPOHL, Gerhard; Geisenheimer Strasse 95, 60529 Frankfurt (DE). WILL, David, William; Kirchstrasse 21, 65830 Krißfel (DE).
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: POLYAMIDE NUCLEIC ACID DERIVATIVES, AGENTS AND METHODS FOR PRODUCING THEM

(54) Bezeichnung: POLYAMIDNUKLEINSÄURE-DERIVATE, MITTEL UND VERFAHREN ZUR IHRER HERSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to PNA derivatives that carry one or more phosphoryl groups at the C terminus or at the C and N terminus of the PNA backbone, said phosphoryl groups optionally carrying one or more marker groups, or groups for cross-linking, or groups that promote the intracellular uptake, or groups that improve the binding affinity of the PNA derivative to nucleic acids. The invention further relates to a method for producing the above PNA derivatives and to the use thereof as a medicament or diagnostic agent.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind PNA-Derivate, die am C-Terminus oder C- und N-Terminus des PNA-Rückgrates einen oder mehrere Phosphoryl-Reste tragen, die gegebenenfalls eine oder mehrere Markergruppen, oder Gruppen zur Quervernetzung, oder Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, oder Gruppen, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigern, tragen. Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung der oben genannten PNA-Derivate und ihre Anwendung als Arzneimittel oder Diagnostikum.

WO 01/79216 A2

Beschreibung:

Polyamidnukleinsäure-Derivate, Mittel und Verfahren zur ihrer Herstellung

- 5 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf carboxyterminal und carboxy-/aminoterminal phosphorylierte Polyamidnukleinsäure-(PNA)-Derivate mit verbesserten Eigenschaften, deren Verwendung, sowie Mittel und Verfahren zu ihrer Herstellung.
- 10 Polyamidnukleinsäuren, auch Peptidnukleinsäuren (PNA) genannt, binden mit höherer Affinität als natürliche Oligonucleotide an komplementäre Zielsequenzen (DNA oder RNA) und haben gegenüber natürlicher DNA zudem den Vorteil, daß sie im Serum sehr stabil sind. PNA waren ursprünglich beschrieben als unnatürliche Nukleinsäure-Analoga, in denen das gesamte
- 15 Zucker-Phosphat-Rückgrat durch N-(2-Aminoethyl)-glycin-Einheiten ersetzt ist (M. Egholm et al. (1991) Science 254, 1497-1500; WO 92/20702; M. Egholm et al. Nature (1993) 365, 566-568; P. Nielsen, (1994) Bioconjugate Chem. 5, 3-7; E. Uhlmann et al. (1998) Angewandte Chemie Int. Ed. Engl. 37, 2796-2823). Als Basen werden die in der Nucleotidchemie üblichen natürlich vorkommenden
- 20 oder auch nicht natürlich vorkommenden Nucleobasen oder deren Prodrugformen benutzt, also Vorstufen, die erst im Organismus durch Biotransformation in die freie Base überführt werden. Darüberhinaus wurden PNAs beschrieben, in denen nicht alle Positionen des Rückgrates Basenreste tragen (Greiner et al. (1999) Helv. Chim. Acta 82, 2151), und in denen Aminoethyl-
- 25 glycin durch komplexere Einheiten ersetzt ist (Uhlmann et al. (1998) Angewandte Chem. Int. Ed. 37, 2796; Falkiewicz (1999) Biochim. Pol., 46, 509-529).

Der ladungsneutrale Charakter des PNA-Rückgrats ist ein wichtiges Merkmal dieser Substanzklasse mit weitreichenden Konsequenzen. Es wird dem

30 neutralen Charakter der PNA und der damit verbundenen verringerten Ladungsabstoßung zugeschrieben, dass PNA selbst bei niedriger Salzkonzentration an komplementäre DNA und RNA bindet (z.B. Peptide

Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999, 3), wobei die Watson-Crick-Basenpaarungsregeln befolgt werden. Daher kann PNA im Prinzip für zahlreiche Anwendungen herangezogen werden, in denen sonst natürliche Oligonucleotide bzw. Oligonucleotid-Derivate eingesetzt werden. Darüber hinaus ergeben sich aber aufgrund der einzigartigen Bindungseigenschaften auch zahlreiche Anwendungen, die mit natürlichen Oligonucleotiden nicht möglich sind (siehe zum Beispiel: Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999). Beispielsweise ist mit PNA eine Stranginvasion an doppelsträngiger DNA beobachtet worden.

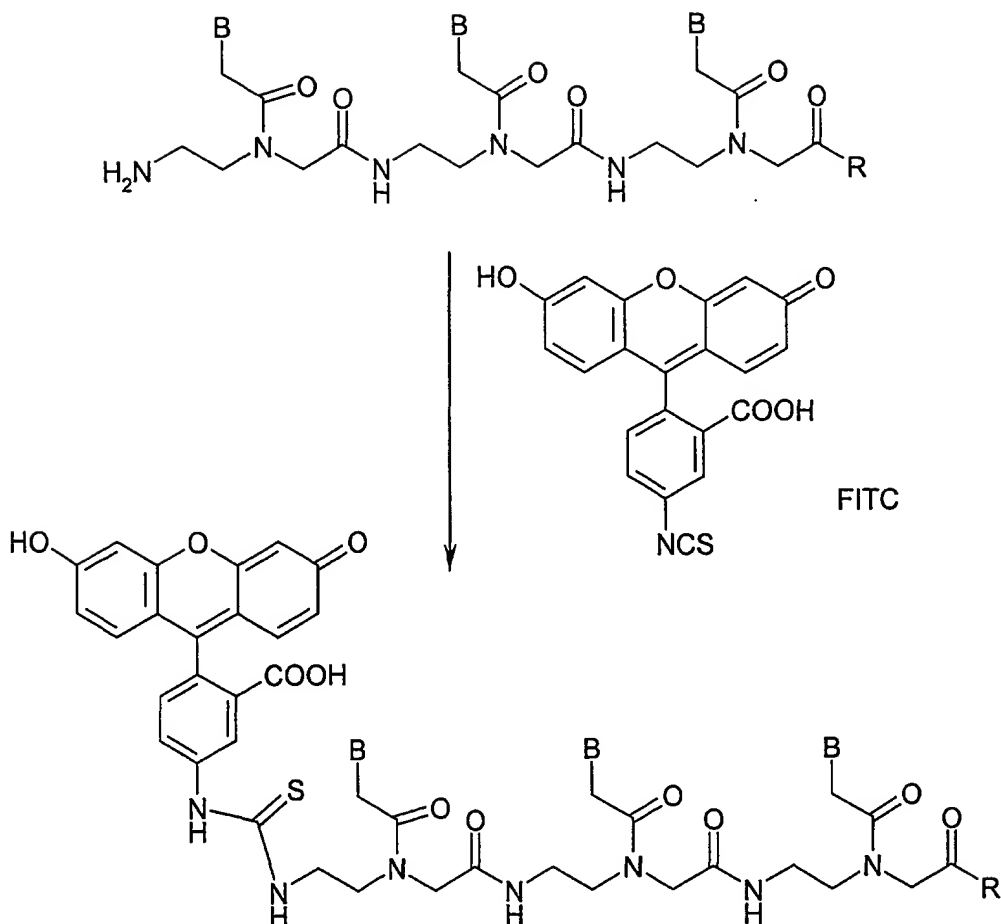
Typische Beispiele zur Anwendung von PNA beinhalten deren Verwendung zur Inhibition der Genexpression durch sequenzspezifische Bindung an die zelluläre DNA oder RNA. „Antisense-Agenzien“ sind kurze einzelsträngige Nukleinsäure-Derivate, die über Watson-Crick Basenpaarung an eine komplementäre mRNA binden, deren Übersetzung in das entsprechende Protein gehemmt werden soll (Uhlmann und Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 543; Larsen et al. (1999) Biochem. Biophys. Acta 1489, 159). „Anti-Gen-Agenzien“ binden über Hoogsteen-Basenpaarung in die große Furche der DNA-Doppelhelix unter Ausbildung einer Tripelhelix, wodurch die Transkription der Gene sequenzspezifisch gehemmt wird (Praseuth et al. (1999) Biochem. Biophys. Acta 1489, 181). Die Genexpression kann auch durch sogenannte „Decoy“-Oligomere, die die Bindungsregionen für Transkriptionsfaktoren nachahmen, spezifisch gehemmt werden. Durch die Behandlung mit Decoy-Agenzien lassen sich bestimmte Transkriptionsfaktoren sequenzspezifisch abfangen und dadurch eine Aktivierung der Transkription verhindern (Mischianti et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 33114). Eine weitere Gruppe von intrazellulär wirkenden Oligonucleotid-Derivaten, die Chimeraplasten, werden zur gezielten Genkorrektur herangezogen (Cole-Strauss et al. (1996) Science 273, 1386-1389).

PNA können daher als Arzneimittel und/oder Diagnostikum bzw. zur Herstellung von Arzneimitteln und/oder Diagnostika verwendet werden.

Für diagnostische Zwecke und in der Molekularbiologie kann PNA beispielsweise
5 nach Markierung mit Biotin, Fluorescein oder anderen Labeln als spezifische
Hybridisierungs-sonde eingesetzt werden. Für die Einführung der
Markergruppen sind in der Literatur bislang vier Methoden beschrieben (Oerum
et al. (1999), in Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications, Seiten 81-
86; Lohse et al. (1997) Bioconjugate Chem. 8, 503). Die erste Methode beruht
10 auf der Markierung der freien (entschützten) PNA nach deren Synthese in
Lösung. Dabei wird der Aminotерminus der PNA mit einer aktivierten
Carbonsäure oder einem Isothiocyanat umgesetzt. Oft werden aber zusätzliche
Lysin-Reste in die PNA eingeführt, die dann mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)
umgesetzt werden.

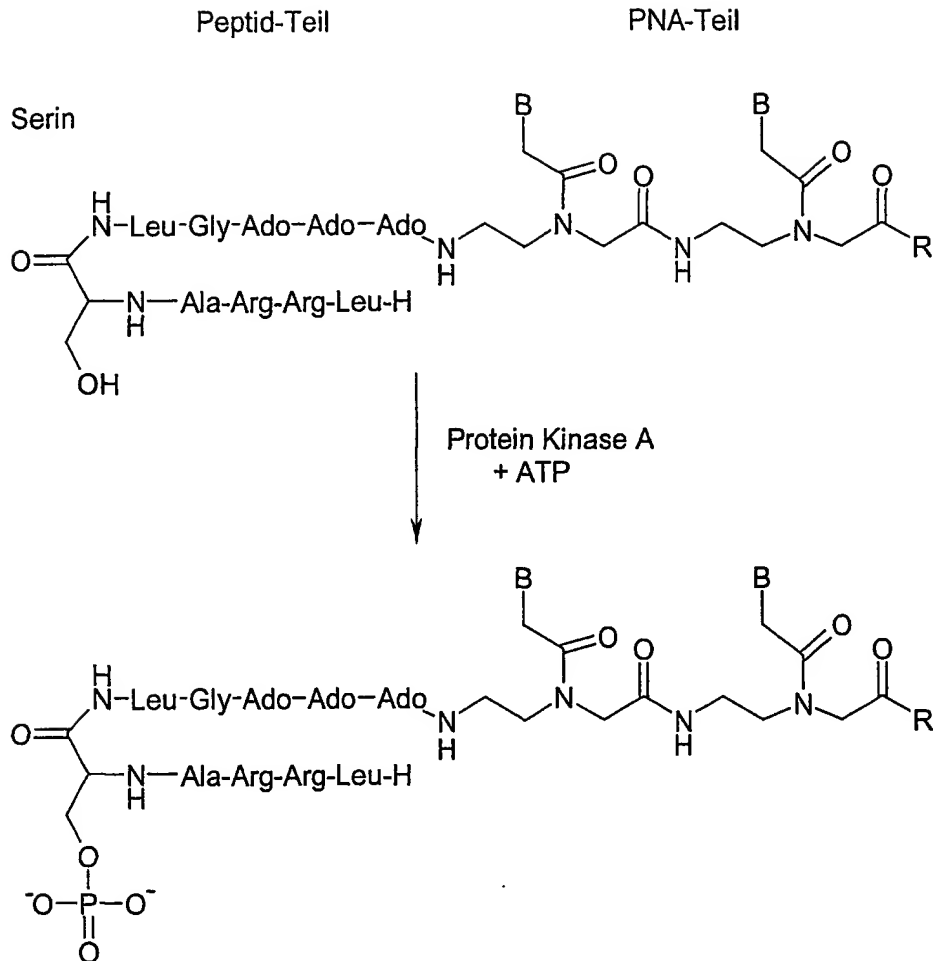
15 Bei der zweiten Methode wird die geschützte PNA noch an der Festphase am
Aminotерminus mit aktivierten Carbonsäure-Derivaten oder Isothiocyanaten
modifiziert. Diese Methode eignet sich nur für Markergruppen, die unter den
Bedingungen der Entschützung der PNA und während der Abspaltung vom
20 Träger stabil sind. Als reaktive Reagenzien werden in beiden Fällen bevorzugt
Isothiocyanate (P. Wittung et al., (1995) FEBS Lett. 375, 27) oder aktivierte
Carbonsäuren, wie beispielsweise N-Hydroxysuccinimidester (NHS), eingesetzt
(Oerum et al., 1999). Ein Nachteil der Reaktion mit den NHS-Derivaten ist,
dass sie oft nur in schlechten Ausbeuten gelingt. Daher wird häufig 8-Amino-
25 3,6-dioxaoctansäure als Linker bzw. Spacer zwischen PNA und Markergruppe
kondensiert (Oerum et al., 1999). Beide Verknüpfungen erfolgen über
Amidbindungen bzw. Thioharnstoffbindungen, die als solche aber eher zu
Unlöslichkeit führen. Alternativ werden die Carbonsäuren mit Hilfe von in der
Peptid-Chemie üblichen Aktivatoren, wie beispielsweise HBTU, TBTU oder
30 HATU zur Reaktion gebracht.

4



Bei einer dritten Methode werden Fluorescein-konjugierte Monomere bei der
 5 Festphasensynthese von PNA verwendet, wobei die Fluoreszenz-Markierung
 über eine Amidbindung erfolgt (Lohse et al. (1997) Bioconjugate Chem. 8, 503),
 die wiederum zu relativ schwerlöslichen Konjugaten führt.

Eine vierte Methode verwendet PNA-Peptid-Konjugate, in denen der Peptid-Teil
 10 ein Substrat für eine Protein-Kinase bildet (Koch et al. (1995) Tetrahedron Lett.
 36, 6933). Auf diese Weise wird also nicht der PNA-Teil modifiziert, sondern der
 Serin-Rest des Peptid-Segments wird enzymatisch phosphoryliert. Mit dieser
 Methode kann also nur radioaktives Phosphat, aber beispielsweise kein
 Fluorescein oder Biotin in das Peptid-Segment des PNA-Peptid-Konjugats
 15 eingeführt werden.



- Es ist bekannt, dass PNA in wässriger Lösung, also auch unter physiologischen
- 5 Bedingungen, zur Aggregation neigt. PNA ist daher in wässrigem Puffer
- schlecht löslich und steht dann nicht für die Hybridisierung an komplementäre
- Sequenzen zur Verfügung. PNA zeigt zudem eine hohe Affinität zu
- verschiedenen Materialien wie Sephadex® (Fa. Pharmacia), Bond Elut® (Fa.
- Varian), oder verschiedene HPLC-Chromatographiematerialien, die bei der
- 10 Aufreinigung der Oligomeren Verwendung finden, so daß die PNA oft nur in
- schlechten Ausbeuten zu isolieren ist. Daher ist es notwendig, die PNA mit
- Lysin oder anderen positiv geladenen Aminosäuren (über den C-Terminus) zu
- konjugieren (Egholm et al (1992) J. Am. Chem. Soc. 114, 1895). Guaninreiche

PNA-Sequenzen tendieren ganz besonders zur Aggregation, weshalb von der Verwendung solcher PNA abgeraten wird (siehe "Guidelines for sequence design of PNA oligomers" in *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications* (1999) Seiten 253-255). Besonders schwerlöslich sind beispielsweise längere
5 Fluorescein-markierte PNA-Oligomere, wobei die Zugabe eines organischen Lösemittels und Erwärmen auf 50°C empfohlen wird.

Die Reinigung der schwerlöslichen lipophilen PNA-Derivate ist besonders schwierig. Bei der HPLC werden oft mehrere Peaks detektiert, die auf PNA-
10 Aggregate zurückzuführen sind. Die für die Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren häufig angewandte Technik der Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese ist für diese PNA-Derivate nicht möglich.

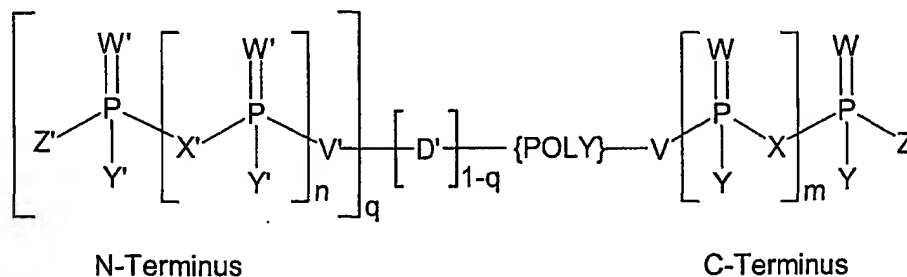
Bei den oben beschriebenen Methoden der Derivatisierung von PNA wird die
15 Marker-Gruppe stets durch Knüpfung einer Amidbindung oder Thioamidbindung eingeführt, wobei relativ schwerlösliche PNA-Derivate gebildet werden.

Insbesondere bei der Einführung lipophiler Reste, wie beispielsweise des Fluoresceins, entstehen schwerlösliche PNA-Derivate. Die Einführung von Markern an beiden Enden der PNA ist technisch noch schwieriger und führt im
20 allgemeinen zu einer noch schlechteren Löslichkeit. Ausserdem sind keine effiziente Methoden für eine gleichzeitige amino- und carboxyterminale Derivatisierung von PNA, insbesondere durch Festphasensynthese beschrieben. Da die Markierungs-Reaktionen zudem oft in schlechten Ausbeuten verlaufen, besteht eine zu lösende Aufgabe darin, neue PNA-
25 Derivate bereitzustellen, welche in hohen Ausbeuten herzustellen sein sollen und vorteilhaften Eigenschaften aufweisen, wie verbesserter Löslichkeit, verbessertem Bindungsverhalten, besserer zellulärer Aufnahme aufweisen sollen, und die zudem den Einsatz effektiver Reinigungsmethoden für die PNA-Oligomeren erlaubt.

30 Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Bereitstellung von PNA-Derivaten, die am C-Terminus oder am C- und N-Terminus des PNA-Rückgrates einen oder mehrere Phosphoryl-Reste tragen, wobei neben Oxo-

- auch Thio- und Imino-Phosphorylreste umfasst sind, und wobei mindestens einer der Phosphoryl-Reste eine oder mehrere deprotonierbare Gruppen, vorzugsweise Hydroxy- oder Mercapto-Gruppen trägt. Die Phosphoryl-Reste sind über eine Sauerstoff-Phosphor, Schwefel-Phosphor oder eine Stickstoff-Phosphor-Bindung entweder direkt oder über einen Spacer mit dem PNA-Rückgrat verknüpft, wobei der Spacer beispielsweise ein Alkanoylamid, ein Poly(alkoxy)carboxamid oder eine Aminosäure sein kann. Beispiele für Phosphoryl-Reste sind Phosphat, Phosphonat, Thiophosphat, Phosphoamidat oder substituierte Phosphoryl-Reste, wobei substituierte Phosphoryl-Reste gegebenenfalls eine oder mehrere Markergruppen, oder Gruppen zur Quervernetzung, oder Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, oder Gruppen, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigern, tragen.
- 15 Unter Markergruppen (Labeln) versteht man dabei Gruppen, die eine qualitative oder quantitative Bewertung der chemischen oder biologischen Aktivität der PNA-Derivate erlauben, beispielsweise Biotin oder Fluoreszein. Unter Quervernetzung (Cross-Linking) versteht man die Ausbildung intra- bzw. intermolekularer Bindungen zwischen räumlich benachbarten Funktionalitäten.
- 20 Eine Gruppe zur Quervernetzung ist beispielsweise die Psoralengruppe.

Die Erfindung betrifft vorzugsweise PNA-Derivate der Formel I



Formel I

wobei

25

q gleich 0 oder 1 ist,

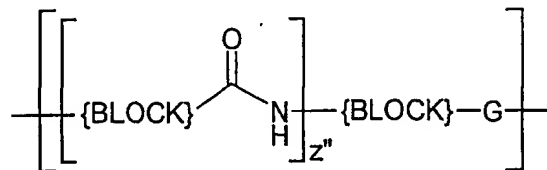
- D' gleich Hydroxy, Mercapto, Amino, Alkylamino oder Acylamino, vorzugsweise Acetylamino, ist,
- 5 V unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel, NR_1 ist,
- V' unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel, NR_1 , eine Gruppe $U-(CR_3R_4)_U-C(O)-NH$ oder eine Gruppe $U-(CH_2CH_2O)_U-CH_2-C(O)-NH$ ist,
- 10 U unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel oder NH ist,
- u' unabhängig voneinander gleich 1 bis 10 ist, vorzugsweise 1 bis 4, besonders bevorzugt 1,
- 15 W und W' unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel oder NR_1 sind,
- Y und Y' unabhängig voneinander gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion, Thioat oder NR_1R_2 sind,
- 20 X und X' unabhängig voneinander gleich eine Gruppe $U-(C_2-C_{22}-AlkandiyI)-U$ oder eine Gruppe $U-(CH_2CH_2-O)_U$ ist, oder gleich eine Markergruppe, oder eine Gruppe zur Quervernetzung, oder eine Gruppe, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigt, oder eine Gruppe, die die Bindungsaffinität
- 25 des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigert, ist, beispielsweise ein bifunktionaler Fluorescein-, Rhodamin-, TAMRA-, Biotin-, Pyren-, Dinitrophenyl-, Cholesteryl-, Acridin-, Adamantyl-, Vitamin E-, Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Edans-,

Lexitropsin-, Psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- oder Digoxigenin-Rest,

- 5 Z und Z' unabhängig voneinander gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion, Thioat oder NR_1R_2 , $\text{C}_1\text{-C}_{22}$ -Alkyl, $\text{C}_1\text{-C}_8$ -Arylalkyl, $\text{C}_1\text{-C}_{22}$ -Alkyl-U, $\text{C}_1\text{-C}_8$ -Arylalkyl-U, Hydroxy- $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ -U, Aminoalkyl-U, Mercaptoalkyl-U ist, oder eine Gruppe der Formel $\text{R}_7(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_m$ ist, wobei R_7 gleich Hydroxy, Amino oder $\text{C}_1\text{-C}_{22}$ -Alkoxy und m gleich 1 bis 100 ist, vorzugsweise 2 bis 10, oder gleich eine Markergruppe, oder eine Gruppe zur Quervernetzung, oder eine Gruppe, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigt, oder eine Gruppe, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigert, ist, beiseiungsweise ein monofunktioneller oder bifunktioneller Fluorescein-, Rhodamin-, TAMRA-, Biotin-, Pyren-, Dinitrophenyl-, Cholesteryl-, Acridin-, Adamantyl-, Vitamin E-, Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Edans-, Lexitropsin-, Psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- oder Digoxigenin-Rest,
- 10 R₁ und R₂ unabhängig voneinander ein Rest bestehend aus Wasserstoff oder $\text{C}_1\text{-C}_6$ -Alkyl bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff,
- 15 R₃ und R₄ unabhängig voneinander ein Rest bestehend aus Wasserstoff oder $\text{C}_1\text{-C}_6$ -Alkyl oder den Rest einer Aminosäure-Seitenkette bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff, wobei benachbarte Reste R₃ und R₄ in V' auch einen $\text{C}_5\text{-C}_8$ -Cycloalkyl-Ring bilden können,
- 20 n gleich 0 bis 10 ist, vorzugsweise 0 bis 3,
- 25 m gleich 0 bis 10 ist, vorzugsweise 0 bis 3,
- 30

mit der Massgabe, dass mindestens ein Rest Y, Y', Z oder Z' gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion oder Thioat ist.

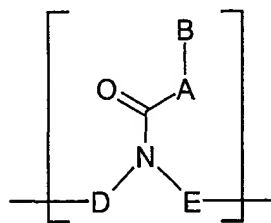
- 5 Die Gruppe {POLY} wird beschrieben durch die Formel II,



Formel II

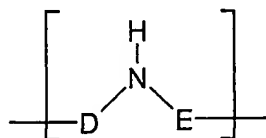
wobei {BLOCK} unabhängig voneinander eine Gruppe ist ausgewählt aus

- 10 Formel IIIA,



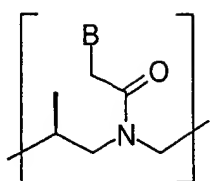
Formel III A

- 15 oder aus Formel IIIB (Greiner et al. (1999) Helv. Chim Acta 82, 2151),

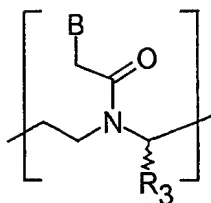


Formel III B

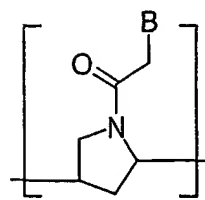
oder aus den Formeln IV A bis IV G (Uhlmann et al. (1998) Angewandte Chem. Int. Ed. 37, 2796; Falkiewicz (1999) Biochim. Pol., 46, 509-529),



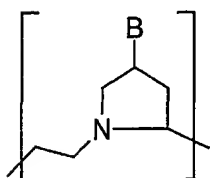
Formel IV A



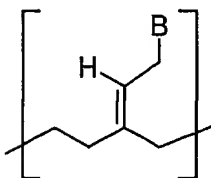
Formel IV B



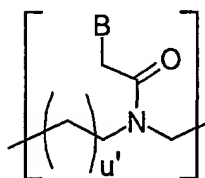
Formel IV C



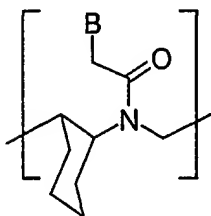
Formel IV D



Formel IV E



Formel IV F



Formel IV G

wobei jeder Baustein {BLOCK} verschieden sein kann,

und wobei ferner gilt, dass

5

z'' gleich 0 bis 100 ist, vorzugsweise 1-20, besonders bevorzugt 4-15,

G ausgewählt wird aus den Gruppen $(CR_5R_6)_{u'}$, $C(O)NH-(CR_1R_2)_{t'}$ oder $C(O)NH-(CH_2CH_2O)_{u'}-CH_2CH_2$ ist, wobei u' die obige Bedeutung hat und t' gleich 2 bis 10 ist, vorzugsweise 6,

10

A unabhängig voneinander eine Gruppe $(CR_1R_2)_s$ ist, wobei s gleich 1 bis 3 ist, vorzugsweise 1,

- B unabhängig voneinander entweder ein aromatischer Rest, der auch heteroaromatischen Charakter besitzen kann, oder Wasserstoff, oder Hydroxy oder C₁-C₁₈-Alkyl ist,
oder eine in der Nucleotidchemie übliche natürlich vorkommende oder
5 eine nicht natürlich vorkommende Nucleobase oder deren Prodrugform ist,
mit der Maßgabe, dass mindestens ein Rest B eine Nucleobase ist,
- D unabhängig voneinander eine Gruppe (CR₃R₄)_t ist, wobei t gleich 2 bis
10 10 ist, vorzugsweise 2 bis 4, besonders bevorzugt 2,
- E unabhängig voneinander eine Gruppe (CR₅R₆)_u ist, wobei benachbarte Reste R₅ und R₆ auch einen C₅-C₈-Cycloalkyl-Ring oder eine
Spiroverbindung bilden können,
15 R₅ und R₆ unabhängig voneinander einen Rest bestehend aus Wasserstoff oder C₁-C₆-Alkyl oder den Rest einer Aminosäure-Seitenkette bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff,
- 20 und wobei u', R₁, R₂, R₃ und R₄ die gleiche Bedeutung wie oben beschrieben haben,
- sowie physiologisch verträglichen Salze der PNA-Derivate der Formel I.
Physiologisch verträglichen Salze sind u.a. beschrieben in Remingtons
25 Pharmaceutical Science (1985) Mack Publishing Company, Easton, PA, USA, Seite 1418. Bevorzugt sind Ammoniumsalze, Trialkylammoniumsalze, Alkalimetallsalze (wie Natrium- und Kaliumsalze) und Erdalkalisalze (wie Magnesium- und Calciumsalze). Besonders bevorzugt sind Natriumsalze.
- 30 Als überraschender positiver Effekt zeigte sich, dass die Einführung eines Phosphoryl-Restes beispielsweise als Phosphat oder auch in Form einer

- lipophilen Derivatisierung (z. B. als Hexadecylphosphodiester) die Affinität der PNA an komplementäre DNA oder RNA erhöht. Dieser Effekt war nicht zu erwarten, da die starke Binding von PNA an komplementäre DNA oder RNA dem neutralen Charakter der PNA und der damit verbundenen reduzierten
- 5 Ladungsabstossung zugeschrieben wurde (z.B. Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999, 3).

- Besonders effektiv erfolgte die Einführung des Biotins über einen
- 10 Phosphorylrest. Die biotinylierte PNA der Formel I (X, X', Z und/oder Z' = Biotinrest) zeigten als Hybridisierungs sonden bessere Bindungseigenschaften und weniger störende unspezifische Hintergrund-Effekte als entsprechende biotinylierte DNA-Sonden.
- 15 Im Gegensatz zur ungeladenen PNA können die erfindungsgemäßen PNA-Derivate der Formel I auch im elektrischen Feld wandern, wodurch eine Mikrolokalisierung und eine Konzentrierung an immobilisierten komplementären Nukleinsäurederivaten möglich ist. Für die polyanionischen Oligonucleotide wurde diese Methode zur raschen Bestimmung von Basenmisspaarungen mit
- 20 Hilfe des elektrischen Felds bereits beschrieben (Sosnowski et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 1119).

- Die Hydroxy- bzw. Mercapto-Substituenten der Phosphoryl-Reste der erfindungsgemäßen PNA-Derivate können in einem pH-Bereich von 4,5 bis 14,
- 25 vorzugsweise 6,5 bis 12, besonders bevorzugt 6,5 bis 9 deprotoniert werden. Die Eigenschaft der Ionisierbarkeit der Phosphoryl-Reste kann vorteilhaft zur Reinigung der Verbindungen der Formel I ausgenutzt werden. Einerseits können die Verbindungen der Formel I durch Elektrophorese, beispielsweise Polyacrylamid-Gelelektrophorese, gereinigt werden. Andererseits ist eine
- 30 Reinigung mit Hilfe von Anionenaustauschern möglich. Dabei werden die gewünschten Produkte bevorzugt durch Anwendung eines Salzgradienten, beispielsweise eines Kochsalz-Gradienten, oder eines pH-Gradienten eluiert.

- Besonders einfach und effizient lassen sich die erfindungsgemäßen PNA-Derivate der Formel I über Anionenaustauscher reinigen. Es zeigte sich, dass die ungeladenen Nebenprodukte nicht auf dem Anionenaustauscher retardiert werden, während das geladene Produkt auf der Säule haftete. Nach Waschen
5 mit Wasser konnte das gewünschte Produkt mit Essigsäure oder einer Kochsalzlösung in reiner Form isoliert werden. Als Anionenaustauscher verwendet man bevorzugt starke Anionenaustauscher, oder Mixed-Mode-Phasen, wie beispielsweise ®Oasis MAX (Waters GmbH, Eschborn).
- 10 Weiterhin zeigte sich, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I generell besser in wässrigem Medium löslich sind als die entsprechenden PNA-Oligomeren ohne den Phosphoryl-Rest. Dies macht sich ganz besonders bei den lipophilen Derivaten, wie beispielsweise den Fluorescein-Derivaten oder Hexadecyl-Derivaten, in Form einer stark verbesserten Löslichkeit in wässrigem
15 Medium bemerkbar.

- Die Erfindung betrifft besonders PNA-Derivate, in denen A und E gleich CH_2 sind. Weiterhin betrifft die Erfindung besonders PNA-Derivate, in denen D gleich $(\text{CH}_2)_2$ sind. Bevorzugt sind ferner PNA-Derivate der Formel I, in denen
20 W und W' gleich Oxo sind, weiterhin solche, in denen Y und Y' gleich Hydroxy oder Oxyanion sind, und solche in denen V und V' gleich Oxy sind.

- Beispiele für natürliche Basen sind Adenin, Cytosin, 5-Methylcytosin, Guanin, Thymin und Uracil. Beispiele für unnatürliche Basen sind Purin, 2,6-Diaminopurin, N^4N^4 -Ethanocytosin, N^6N^6 -Ethano-2,6-diaminopurin, 5-($\text{C}_3\text{-C}_6$)-
25 Alkynyl-uracil, 5-($\text{C}_3\text{-C}_6$)-Alkynyl-cytosin, 5-(1-Propargylamino)-uracil, 5-(1-Propargylamino)-cytosin, Phenoxazin, 9-Aminoethoxyphenoxazin, 5-Fluor-uracil oder Pseudoisocytosin, 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil, Pseudouracil, Dihydrouracil, 5-($\text{C}_1\text{-C}_6$)-Alkyl-uracil, 5-($\text{C}_1\text{-C}_6$)-Alkyl-cytosin, 5-($\text{C}_2\text{-C}_6$)-Alkenyl-
30 cytosin, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-

Bromcytosin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, 8-Azapurin, oder 7-Deaza-7-substituierte Purine.

Für PNA-Derivate, die nur C-terminal einen Phosphoryl-Rest tragen (für die q
5 gleich 0 ist), kann der N-Terminus mit einer Peptidsequenz verknüpft sein. Als
Peptidsequenzen kommen bevorzugt solche in Betracht, die Organverteilung
oder die zelluläre Lokalisierung des PNA optimieren, wie beispielsweise
Transportan, Insulin-like Growth Factor, Nuclear Localisation Signale oder
andere Carriersequenzen (Larsen et al. (1999) Biochim. Biophys. Acta 159-
10 166). Das Peptid kann auch als Affinitäts-Tag dienen, wie etwa eine (His)₆
Kette.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht eine breite Variation der Reste X, X', Z
und Z' (Beispiele sind in Figuren 1a, 1b, 2a, 2b, 3a und 3b gegeben) und erlaubt
15 so die Einführung unterschiedlicher spezifischer Funktionsmerkmale in PNA.

Eine bevorzugte Ausführungsform von Z bzw. Z' ist ein C₁- bis C₂₂-Alkyl-Rest.
Bevorzugt sind auch C₁- bis C₂₂-Alkoxy-Reste, insbesondere C₁₆-Alkoxy-
Reste. Andere bevorzugte Reste sind Hydroxy-(C₁-C₁₈-Alkoxy)-Reste,
20 insbesondere HO(CH₂)₃₋₁₂O. Weiterhin bevorzugt sind Aminoalkoxy-Reste,
insbesondere 6-Aminohexoxy- und 5-Aminopentoxy-Reste. Weiterhin bevorzugt
sind Reste der Formel R₇-(CH₂CH₂-O)_m, wobei R₇ gleich Hydroxy, Amino oder
C₁-C₂₂-Alkoxy ist, bevorzugt aber Hydroxy ist, und m gleich 0 bis 100,
bevorzugt 2 bis 10 ist. Besonders bevorzugt sind HO(CH₂CH₂-O)₂,
25 HO(CH₂CH₂-O)₆ und H₂N-(CH₂CH₂-O)₂. Weitere bevorzugte Beispiele von Z
bzw. Z' umfassen Mercaptoalkoxy-Reste, insbesondere 6-Mercaptohexyloxy.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst Z bzw. Z' eine
fluoreszierende Gruppe wie Fluorescein, Rhodamin, TAMRA oder einen

Cyanin-Farbstoff. Bevorzugte fluoreszierende Gruppen sind in den Figuren 1a bis 3b zu finden. Ganz besonders bevorzugt ist auch Biotin für Z. Andere bevorzugte Gruppen für Z umfassen Dabcyl, Psoralen, Acridin, DNP und Cholesterol (Figuren 1b und 2b), BODIPY-, ROX- oder R6G-Reste (Su-Chun Hung et al. (1998) Analytical Biochemistry 255, 32-38) und Digoxigenin (Tarrason et al., Methods in Enzymology (1999) Vol. 313, 257-268).

Darüberhinaus kann Z bzw. Z' gleich einer Gruppe bestehend aus einem monofunktionellen oder einem bifunktionellen Fluorescein-, Rhodamin-, TAMRA-, Biotin-, Pyren-, Dinitrophenyl-, Cholesteryl-, Acridin-, Adamantyl-, Vitamin-E-, Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Edans-, Lexitropsin-, oder Psoralen-Rest sein. Monofunktionelle Endgruppen sind beispielhaft in den Figuren 1a, 1b, 2a und 3a ausgeführt, bifunktionelle verbrückende Gruppen sind in Figuren 2b und 3b aufgeführt. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist n und/oder m unabhängig voneinander gleich 0, d.h. der PNA-Teil trägt am N- und/oder am C-Terminus jeweils nur einen Phosphoryl-Rest.

Eine bevorzugte Ausführungsform von X bzw. X' ist U-(C₂-C₂₂-Alkandiy)-U, insbesondere O-(C₂-C₂₂-Alkandiy)-O, besonders bevorzugt O-(CH₂)₂₋₆-O. Eine andere bevorzugte Ausführungsform von X bzw. X' ist eine Gruppe der Formel U-(CH₂CH₂-O)_u' ist, wobei u' gleich 1 bis 10 ist, bevorzugt 1 bis 6, und wobei U bevorzugt Oxy ist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst X bzw. X' eine fluoreszierende Gruppe wie Fluorescein, Rhodamin, TAMRA oder einen Cyanin-Farbstoff, beispielsweise Cy3® (Fa. Amersham Pharmacia Biotech). Bevorzugte bifunktionelle Gruppen sind in den Figuren 2a und 3a zu finden. Ganz besonders bevorzugt ist auch Biotin für X bzw. X'. Andere bevorzugte Gruppen sind Dabcyl-, Psoralen-, Acridin-, DNP-, Cholesterol-, BODIPY-, Lexitropsin-, Digoxigenin-, ROX- und R6G-Reste.

Die unterschiedlichen Reste für X, X', Z und Z' in Formel I können unterschiedliche Funktionen erfüllen. Die Fluorescein-Reste haben

weitreichende Anwendungen bei der DNA-Sequenzierung, Signalamplifikation oder als Marker zur Bestimmung der zellulären Aufnahme von PNA. Die Cyanin-Farbstoff-Reste (Cy3® und Cy5®) ergeben ein wesentlich intensiveres und länger anhaltendes Fluoreszenzsignal als Fluorescein selbst. Der Psoralen-
5 Rest wird zur Quervernetzung (Cross-Linking) mit komplementären Nukleinsäuren eingesetzt. Der Acridin-Rest ist ein effektiver Interkalator und kann damit die Bindungsaffinität der PNA verstärken. Biotin-, Acridin- und Psoralen-Derivate können auch für Antisense-Experimente eingesetzt werden. Weiterhin können Hexadecyloxy- und Cholesterol-Derivate zur Erhöhung der
10 Membrangängigkeit der PNA angewandt werden. DNP-markierte Verbindungen der Formel I lassen sich mit anti-DNP-Antikörpern nachweisen. Aminoalkoxy-Reste lassen sich zur Kupplung weiterer Gruppen, wie beispielsweise Lexitropsin (vgl. Beispiel 17; PNA-16), nutzen. In ähnlicher Weise lassen sich auch Mercaptoalkoxy-Gruppen zur weiteren Derivatisierung nutzen.

15 Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der PNA-Derivate der Formel I als Arzneimittel. Diese Arzneimittel können zur Prävention und/oder Behandlung von Krankheiten, die mit der Expression bzw. einer Überexpression bestimmter Gene einhergehen, eingesetzt werden. Weiterhin betrifft die
20 Erfindung die Verwendung von PNA-Derivaten als Diagnostikum. Diese Diagnostika können zur Früherkennung der oben genannten Krankheiten eingesetzt werden.

Als Arzneimittel bzw. Diagnostikum lassen sich die PNA-Derivate der Formel I in Abhängigkeit ihrer Sequenz als Antisense-, Antigene-, Decoy-, und
25 Chimeraplast-Agenzien nutzen.

Die erfindungsgemäßen PNA-Derivate werden insbesondere zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krankheiten verwendet, bei denen definierte Gene durch Überexpression ursächlich bzw. beteiligt ist.

30 Diese Arzneimittel können beispielsweise zur Behandlung von Erkrankungen verwendet werden, die durch Viren hervorgerufen werden, beispielsweise durch

CMV, HIV, HSV-1, HSV-2, Influenza, VSV, Hepatitis B oder Papilloma Viren, wobei die entsprechende Virus-Sequenz das Target ist.

Erfindungsgemäße Antisense-PNA-Derivate, die gegen solche Targets wirksam
5 sind, haben beispielsweise folgende Basensequenz.

a) gegen CMV, z. B.

SEQ ID NO: 1 5'-G C G T T T G C T C T T C T T C T T G C G-3'
10

b) gegen HIV, z. B.

SEQ ID NO: 2 5'-A C A C C C A A T T C T G A A A A T G G -3'
SEQ ID NO: 3 5'-A G G T C C C T G T T C G G G C G C C A-3'
15

c) gegen HSV-1, z.B.

SEQ ID NO: 4 5'-G C G G G G C T C C A T G G G G G T C G-3'

20 Solche Arzneimittel eignen sich beispielsweise auch zur Behandlung von Krebs. Vorzugsweise können dabei Sequenzen zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Krebsentstehung bzw. Krebswachstum verantwortlich sind, insbesondere durch die Inhibition der Telomerase (E. Matthes et al. (1999) Nucleic Acids Res. 27, 1152). Solche Targets sind
25 weiterhin:

1) Nucleare Onkoproteine wie beispielsweise c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120,

30 2) Cytoplasmische/Membran-assoziierte Onkoproteine wie beispielsweise EJ-ras, c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl, c-ets,

3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise EGF-Rezeptor, Her-2, c-erbA, VEGF-Rezeptor (KDR-1), Retinoid-Rezeptoren, Protein-Kinase regulatorische Untereinheit, c-fms, Tie-2, c-raf-1 Kinase, PKC-alpha, Protein Kinase A (R1 alpha),

5

4) Cytokine, Wachstumsfaktoren, Extrazelluläre Matrix wie beispielsweise CSF-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, bFGF, VEGF, Myeloblastin, Fibronectin.

10 Antisense-PNA-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) gegen c-Ha-ras, z. B.

15 SEQ ID NO: 5 5'-CAGCTGCAACCCAGC-3'
SEQ ID NO: 6 5'-TATTCCGTCAT-3'
SEQ ID NO: 7 5'-TTCCGTCATCGCTCCTCAGGGG-3'

b) bFGF, z.B.

20

SEQ ID NO: 8 5'-GGCTGCCATGGTCCC-3'

c) c-myc, z.B.

25 SEQ ID NO: 9 5'-GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC-3'
SEQ ID NO: 10 5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'

d) c-myb, z.B.

30 SEQ ID NO: 11 5'-GTGCCGGGGTCTTCGGGC-3'

e) c-fos, z.B.

SEQ ID NO: 12 5'-CGAGAACATCATCGTGG-3'
SEQ ID NO: 13 5'-GGAGAACATCATGGTCGAAAG-3'
SEQ ID NO: 14 5'-CCCGAGAACATCATGGTCGAAAG-3'
5 SEQ ID NO: 15 5'-GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG-3'

f) p120, z. B.

SEQ ID NO: 16 5'-CACCCGCCTTGGCCTCCCAAC-3'

10

g) EGF-Rezeptor, z.B.

SEQ ID NO: 17 5'-GGGACTCCGGCGCAGCGC-3'
SEQ ID NO: 18 5'-GGCAAACCTTTCTTTTCCTCC-3'

15

h) p53 Tumorsuppressor, z.B.

SEQ ID NO: 19 5'-GGGAAGGAGGAGGATGAGG-3'
SEQ ID NO: 20 5'-GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG-3'

20 i) bcl-2, z. B.

SEQ ID NO: 21 5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'

k) VEGF, z. B.

25

SEQ ID NO: 22 5'-GCGCTGATAGACATCCATG-3'
SEQ ID NO: 23 5'-GGAGGCCCGACC-3'
SEQ ID NO: 24 5'-GGTTTCGGAGGC-3'
SEQ ID NO: 25 5'-TGGTGGAGGTAG-3'
30 SEQ ID NO: 26 5'-GCATGGTGGAGG-3'
SEQ ID NO: 27 5'-TTGGCATGGTGG-3'
SEQ ID NO: 28 5'-GCGTGGGACCAC-3'

SEQ ID NO: 29 5'-C A G C C T G G G A C C-3'
SEQ ID NO: 30 5'-T G C A G C C T G G G A-3'
SEQ ID NO: 31 5'-G T G C A G C C T G G G-3'
SEQ ID NO: 32 5'-G G T G C A G C C T G G-3'
5 SEQ ID NO: 33 5'-A T G G G T G C A G C C-3'
SEQ ID NO: 34 5'-G G C T T G A A G A T G-3'
SEQ ID NO: 35 5'-G C A G C C C C C G C A-3'
SEQ ID NO: 36 5'-G C A G C A G C C C C C-3'

10 l) c-raf Kinase, z. B.

SEQ ID NO: 37 5'-T C C C G C C T G T G A C A T G C A T T-3'

m) PKC-alpha, z. B.

15

SEQ ID NO: 38 5'-G T T C T C G C T G G T G A G T T T C A-3'

n) Protein Kinase A, z. B.

SEQ ID NO: 39 5'-G C G T G C C T C C T C A C T G G C-3'

20

Arzneimittel enthaltend PNA-Derivate der Formel I eignen sich beispielsweise ferner zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Integrine oder Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren beeinflusst werden, beispielsweise durch VLA-4, VLA-2, ICAM, VCAM oder ELAM.

25

Antisense-PNA-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) VLA-4, z. B.

30

SEQ ID NO: 40 5'-G C A G T A A G C A T C C A T A T C-3'

b) ICAM-1, z. B.

SEQ ID NO: 41 5'-G C C C A A G C T G G C A T C C G T C A-3'
 SEQ ID NO: 42 5'-C C C C C A C C A C T T C C C C T C T C-3'
 5 SEQ ID NO: 43 5'-C T C C C C C A C C A C T T C C C C T C-3'
 SEQ ID NO: 44 5'-G C T G G G A G C C A T A G C G A G G-3'

c) ELAM-1, z. B.

10 SEQ ID NO: 45 5'-A C T G C T G C C T C T T G T C T C A G G -3'
 SEQ ID NO: 46 5'-C A A T C A A T G A C T T C A A G A G T T C-3'

d) Integrin alpha(V), z. B.

15 SEQ ID NO: 47 5'-G C G G C G G A A A G C C A T C G -3'

Arzneimittel enthaltend PNA-Derivate der Formel I eignen sich beispielsweise auch zur Verhinderung der Restenose. Dabei können PNA-Sequenzen zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Proliferation oder
 20 Migration verantwortlich sind. Solche Targets sind beispielsweise:

1) Nucleare Transaktivator-Proteine und Cycline wie beispielsweise c-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, Cycline und cdc2-Kinase

25 2) Mitogene oder Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF, bFGF, VEGF, EGF, HB-EGF und TGF- β .

3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise bFGF-Rezeptor, EGF-Rezeptor und PDGF-Rezeptor.

30

Antisense-PNA-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) c-myb, z. B.

SEQ ID NO: 48 5'-G T G T C G G G G T C T C C G G G C-3'

5

b) c-myc, z. B.

SEQ ID NO: 49 5'-C A C G T T G A G G G G C A T-3'

10 c) cdc2-Kinase, z. B.

SEQ ID NO: 50 5'-G T C T T C C A T A G T T A C T C A-3'

d) PCNA (proliferating cell nuclear antigen of rat), z. B.

15

SEQ ID NO: 51 5'-G A T C A G G C G T G C C T C A A A-3'

PNA-Derivate können ebenfalls zur Behandlung von Vitiligo und anderen Depigmentierungskrankheiten bzw. Depigmentierungsstörungen (z.B. der Haut, 20 Haare, Augen) wie beispielsweise Albinismus und Psoriasis verwendet werden, oder zur Behandlung von Asthma, wobei die Expression des Adenosin-A1-Rezeptors, Adenosin-A3-Rezeptors, Bradikinin-Rezeptors oder von IL-13 mit Hilfe geeigneter Antisense Agenzien inhibiert werden. Eine solche Basensequenz ist beispielsweise:

25

SEQ ID NO: 52 5'-G A T G G A G G G C G G C A T G G C G G G-3'

Arzneimittel enthaltend ein PNA-Derivat der Formel I können z.B. in Form von pharmazeutischen Präparaten, die man oral, z.B. in Form von Tabletten, 30 Dragees, Hart- oder Weichgelatine kapseln, Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen verabreichen kann, verwendet werden. Sie können auch rektal z.B. in Form von Suppositorien oder parenteral z.B. in Form von

- Injektionslösungen verabreicht werden. Für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten können diese Verbindungen in therapeutisch inerten organischen und anorganischen Trägern verarbeitet werden. Beispiele von solchen Trägern für Tabletten, Dragees und Hartgelatine kapseln sind
- 5 Laktose, Maisstärke oder Derivate davon, Talg und Stearinsäure oder Salze davon. Geeignete Träger für die Herstellung von Lösungen sind Wasser, Polyole, Saccharose, Invertzucker und Glucose. Geeignete Träger für Injektionslösungen sind Wasser, Alkohole, Polyole, Glycerol und pflanzliche Öle. Geeignete Träger für Suppositorien sind pflanzliche und gehärtete Öle,
- 10 Wachse, Fette und halbflüssige Polyole. Die pharmazeutischen Präparate können auch Konservierungsmittel, Lösemittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel, Emulgatoren, Süßstoffe, Farbstoffe, Geschmacksmittel, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer, Überzugsmittel, Antioxidantien, sowie ggf. andere therapeutische Wirkstoffe enthalten.
- 15 Bevorzugte Verabreichungsformen sind topische Applikationen, lokale Applikationen wie beispielsweise mit Hilfe eines Katheters oder durch Inhalation, Injektionen bzw. Infusionen und die orale Verabreichung. Zur Injektion werden die PNA-Derivate der Formel I in einer flüssigen Lösung, vorzugsweise in einem physiologisch annehmbaren Puffer, wie z.B. Hank's
- 20 Lösung oder Ringer's Lösung, formuliert. Die Oligonucleotide können aber auch in fester Form formuliert werden und vor dem Gebrauch gelöst oder suspendiert werden. Die für die systematische Verabreichung bevorzugten Dosierungen betragen ca. 0,01 mg/kg bis ca. 50 mg/kg Körpergewicht und Tag.
- 25 Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zubereitungen, die PNA-Derivate der Formel I und/oder deren physiologisch verträgliche Salze neben pharmazeutisch einwandfreien Träger- und/oder Zusatzstoffen enthalten. Die PNA-Derivate der Formel I und/oder deren physiologisch verträglichen Salze können am Tier, bevorzugt am Säugetier, und insbesondere am
- 30 Menschen als Arzneimittel für sich allein, in Mischungen untereinander oder in Form von pharmazeutischen Zubereitungen verabreicht werden, die eine topische, perkutane, parenterale oder enterale Anwendung gestatten und die

als aktiven Bestandteil eine wirksame Dosis mindestens eines PNA-Derivats, neben üblichen pharmazeutisch einwandfreien Träger- und Zusatzstoffen enthalten. Die Zubereitungen enthalten normalerweise etwa 0,1 bis 90 Gew.-% der therapeutisch wirksamen Verbindung. Zur Behandlung von Hautkrankheiten
5 wird eine topische Anwendung, z.B. in Form von Salben, Lotionen oder Tinkturen, Emulsionen, Suspensionen bevorzugt.

Die Herstellung der pharmazeutischen Präparate erfolgt in an sich bekannter Weise, (z. B. Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publ. Co., Easton,
10 PA.), wobei pharmazeutisch inerte anorganische und/oder organische Trägerstoffe verwendet werden. Für die Herstellung von Pillen, Tabletten, Dragees und Hartgelatine kapseln kann man z.B. Lactose, Maisstärke und/oder Derivate derselben, Talk, Stearinsäure und/oder deren Salze etc. verwenden. Trägerstoffe für Weichgelatine kapseln und/oder Suppositorien sind z.B. Fette,
15 Wachse, halbfeste und flüssige Polyole, natürliche und/oder gehärtete Öle etc. Als Trägerstoffe für die Herstellung von Lösungen und/oder Sirupen eignen sich z.B. Wasser, Saccharose, Invertzucker, Glukose, Polyole etc. Als Trägerstoffe für die Herstellung von Injektionslösungen eignen sich Wasser, Alkohole, Glycerin, Polyole, pflanzliche Öle etc. Als Trägerstoffe für Mikrokapseln,
20 Implantate und/oder Rods eignen sich Mischpolymerisate aus Glykolsäure und Milchsäure. Darüber hinaus sind Liposomenformulierungen, die dem Fachmann bekannt sind, geeignet (N. Weiner, Drug Develop Ind Pharm 15 (1989) 1523; "Liposome Dermatics, Springer Verlag 1992), beispielsweise HVJ-Liposomen (Hayashi, Gene Therapy 3 (1996) 878). Die dermale Applikation
25 kann beispielsweise auch unter Zuhilfenahme ionophoretischer oder Methoden und/oder mit Hilfe der Elektroporation erfolgen.

Eine pharmazeutische Zubereitung kann neben den Wirk- und Trägerstoffen noch Zusatzstoffe, wie z.B. Füllstoffe, Streck-, Spreng-, Binde-, Gleit-, Netz-,
30 Stabilisierungs-, Emulgier-, Konservierungs-, Süß-, Färbe-, Geschmacks- oder Aromatisierungs-, Dickungs-, Verdünnungsmittel, Puffersubstanzen, ferner Lösungsmittel und/oder Lösungsvermittler und/oder Mittel zur Erzielung eines

- Depoteffekts, sowie Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Überzugsmittel und/oder Antioxidantien enthalten. Sie können auch zwei oder mehrere verschiedene PNA-Derivate der Formel I und/oder deren physiologisch verträgliche Salze enthalten sowie ferner neben mindestens einem PNA-
- 5 Derivate der Formel I einen oder mehrere andere therapeutisch wirksame Stoffe. Die Dosis kann innerhalb weiter Grenzen variieren und ist in jedem einzelnen Fall den individuellen Gegebenheiten anzupassen.

- Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von PNA-Derivaten der Formel
- 10 I als Diagnostikum, insbesondere als Hilfsmittel in der DNA-Diagnostik und in der Molekularbiologie (siehe zum Beispiel: Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999). In der DNA-Diagnostik spielen Gensonden, auch DNA-Sonden oder Hybridization-Sonden genannt, eine große Rolle zum sequenzspezifischen
- 15 Nachweis bestimmter Gene. Eine Gensonde besteht im allgemeinen aus einer Erkennungssequenz und einer bzw. mehreren geeigneten Markergruppen (Labeln). Die Spezifität der Bestimmung einer Targetsequenz in einer Analysenprobe mittels Hybridisierung mit einer komplementären Gensonde wird durch die Erkennungssequenz und deren chemische Struktur determiniert.
- 20 Diese Technik kann auf PNA übertragen werden. Die PNA hat gegenüber den Oligonucleotiden natürlicher Struktur den Vorteil, dass sie eine höhere Affinität zur Targetsequenz und eine höhere Fähigkeit zur Basendiskriminierung aufweist.

- 25 Die Anwendung der Verbindungen der Formeln I bezieht sich daher auch auf die in-situ-Hybridisierung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die in-situ-Hybridisierung kann beispielsweise auch zum Nachweis von Mikroorganismen und Viren dienen (Just et al. (1998) J. Vir. Method. 73, 163-174). Eine weitere Anwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen bezieht sich
- 30 zum Nachweis und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Hierzu bedient man sich bevorzugt auch der Array-Technologie (Strother et al. J. Am. Chem. Soc. (2000) 122, 1205-1209; Niemeyer et al., Angew. Chem. (1999) 111, 3039-3043;

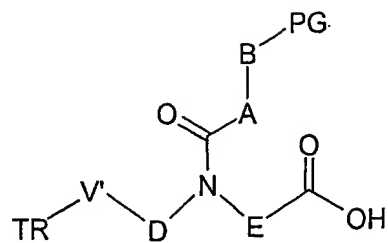
Pirring (1997) Chem. Rev. 97, 473-488), die einen hohen Probendurchsatz und hohe Empfindlichkeit aufweist. Dabei werden die PNA-Sonden auf einem geeigneten Träger oder PNA-Chip fixiert. Hierzu kann PNA wie in den Beispielen beschrieben synthetisiert werden und nachfolgend auf den Träger
5 oder PNA-Chip fixiert werden. Alternativ kann die PNA direkt auf dem Träger hergestellt werden. Eine weitere Anwendung ist der Einsatz der Verbindungen der Formel I als Biosensoren zur Detektion von Nukleinsäuren (Wang et al (1996) J. Am. Chem. Soc. 118, 7667). Der Einsatz von PNA der Formel I mit einem Affinitätslabel, wie beispielsweise Histidyl-PNA, ist eine weitere
10 Anwendung zur Reinigung von Nukleinsäuren (Oerum et al. (1999), in Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications).

Die beiden Phosphorylreste am Amino- und Carboxy-Terminus können unterschiedliche Funktionen erfüllen. Beispielsweise kann der Amino-Terminus
15 zur Erhöhung der zellulären Aufnahme lipophil substituiert sein, während sich am Carboxy-Terminus ein Fluorescein-Rest zum Nachweis der verbesserten Zellaufnahme befindet (vgl. PNA-6 in Beispiel 7).

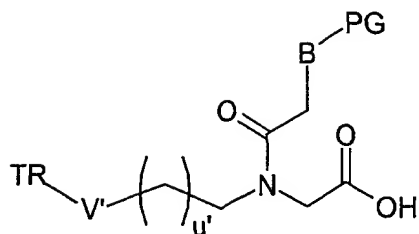
Die zweifach derivatisierten Verbindungen der Formel I eignen sich auch als
20 sogenannte "Molecular Beacons" (Li et al. (2000) Angew. Chemie 112, 1091-1094), die erst bei der Bindung an eine komplementäre Nukleinsäure ein Fluoreszenzsignal abgeben. In diesen Beacons ist ein Ende der PNA, beispielsweise der Amino-Terminus, mit einem Fluoreszenz-Label versehen, während das andere Ende, beispielsweise der Carboxy-Terminus, mit einem
25 Quencher versehen ist. Auch der umgekehrte Fall, in dem der N-Terminus einen Quencher trägt, und der C-Terminus ein Fluoreszenz-Label, ist möglich. Dadurch kommt es zur Unterdrückung des Fluoreszenzsignals, solange das zweifach markierte PNA-Derivat nicht an eine komplementäre Nukleinsäure bindet. Erst bei der Bindung werden der Fluoreszenz-Rest (z.B. Edans) und der
30 Quencher (z. B. Dabcyl) räumlich voneinander getrennt, so dass ein Fluoreszenzsignal ausgesandt wird (Sokol et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 11538).

Die Synthese des PNA-Rückgrates erfolgt nach den in der Literatur beschriebenen Methoden, zum Beispiel nach der tert-Butyloxycarbonyl- (BOC), 9-Fluorenylmethoxycarbonyl- (Fmoc) oder Monomethoxytrityl- (Mmt)

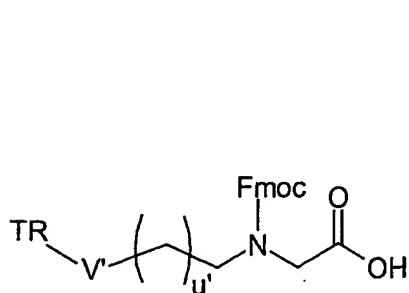
- 5 Schutzgruppen-Strategie (Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999). Vorzugsweise wird die Mmt-Schutzgruppe zum temporären Schutz der Aminofunktion des Aminoethylglycins verwendet und basenlabile Schutzgruppen an den heterozyklischen Nucleobasen (D. Will et al. (1995) Tetrahedron 51, 12069; Breipohl et al. (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686). Beispiele für Monomerbausteine sind Verbindungen der Formel V bis V D, wobei A, B, D, E, u' und V' obige Bedeutung haben, PG eine Aminosäure-Schutzgruppe wie beispielsweise Benzoyl, Anisoyl-, Isobutyryl-, Acetyl-, tert-Butylbenzoyl (Breipohl et al. (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686) ist, TR eine säurelabile Schutzgruppe wie Dimethoxytrityl (Dmt) (für V' = O und S) oder Mmt (für V' = NH) ist.
- 10
- 15



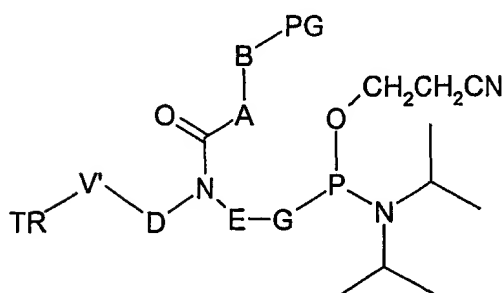
Formel V



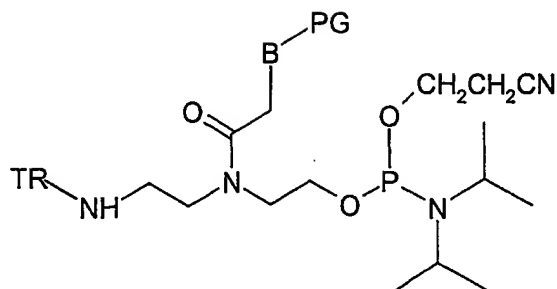
Formel V A



Formel V B



Formel V C



Formel V D

Nach Aufbau des PNA-Rückgrates kann die freie Aminofunktion des N-Terminus direkt mit einem entsprechenden Phosphorylierungsreagenz beispielsweise zu einem Phosphoramidat ($V' = NR_1$ in Formel I) umgesetzt

5 werden.

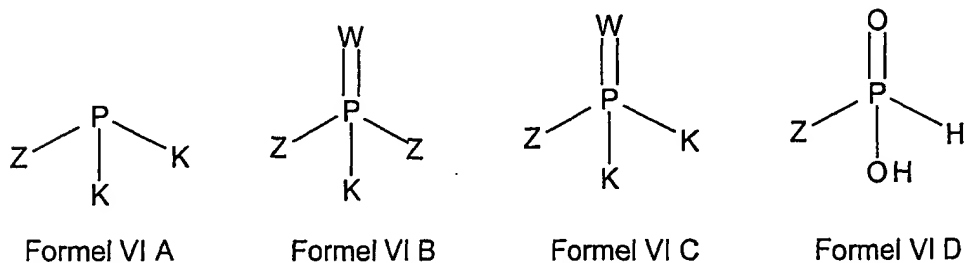
Die Phosphoryl-Reste können mit Hilfe von in der Nucleotid-Chemie üblicherweise verwendeten Reagenzien eingeführt werden. Es sind zahlreiche Phosphorylierungsreagenzien zugänglich, die zur Herstellung der Verbindungen der Formel I herangezogen werden können. Eine Auswahl der Reagenzien ist in

10

den Figuren 4a bis 4d gezeigt, wobei die Erfindung aber nicht auf diese spezielle Derivate beschränkt ist. Für die carboxyterminale Modifikation kommen entsprechend modifizierte Träger, insbesondere CPG-Träger für die Festphasensynthese zum Einsatz. Beispiele solcher Träger sind in Figur 6
5 aufgeführt.

Als Phosphorylierungsreagenzien können die in der Nucleotidchemie üblichen Reagenzien eingesetzt werden (Glen Research Corporation, Sterling, VA 20164, U.S.A.; Figur 4a bis 4d), die beispielsweise nach der Phosphoramidit-
10 Methode, der H-Phosponat-Methode oder der Phosphotriester-Methode reagieren (E. Sonveaux (1986) Bioorganic Chemistry 14, 274; S. L. Beaucage und R. P. Iyer (1993) Tetrahedron 49, 1925; E. Uhlmann und A. Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 543). Die Vielfalt der möglichen Modifikationen ist durch die große Zahl der bekannten Phosphorylierungsreagenzien und entsprechend
15 derivatisierter Träger, insbesondere von controlled pore glass (CPG) Trägern, bestimmt. Als feste Träger werden ausserdem bevorzugt tentagel® (Fa. Rapp Polymers GmbH, Tübingen) und Aminomethylpolystyren benutzt.

Zur Einführung der Phosphoryl-Funktion kommen im Prinzip alle in der
20 Nucleotidchemie bekannten Reagenzien in Betracht, insbesondere aber die folgenden Reagenzien der Formel VI A, Formel VI B, Formel VI C und Formel VI D,



25

wobei K gleich Halogen, bevorzugt Cl, Triazolyl, Imidazolyl, oder Dialkylamino ist, W die oben genannte Bedeutung oder die Bedeutung von W' haben kann, und Z die oben genannte Bedeutung oder die Bedeutung von X, X' oder Z' haben kann, wobei reaktive Gruppen entsprechend geschützt sind.

Beispielsweise sind die Hydroxygruppen des Fluorescein-Phosphoramidits 3 (Figur 4a) durch Veresterung mit Pivalinsäure geschützt.

- Die Verbindungen der Formel VI sind nur als Beispiele für solche Reagenzien zu sehen, die gegebenenfalls unter Zugabe weiterer Hilfsreagenzien wie Basen, Säuren oder Kondensationsreagenzien reagieren. Besonders bevorzugt sind die Reagenzien der Formel VI A, die nach der Phosphoramidit-Methode reagieren (Beaucage und Iyer, 1993). Diese werden als Phosphor-(III)-Verbindung zur Reaktion gebracht und anschließend oxidiert. Wird die Oxidation beispielsweise mit Jod/Wasser/Pyridin oder tert-Butylhydroperoxid durchgeführt, erhält man die Phosphorylderivate ($W = O$). Erfolgt die Oxidation dagegen mit elementarem Schwefel oder Beaucage-Reagenz, so erhält man die entsprechende Thiophosphoryl-Verbindung ($W = S$).
- Unter den Reagenzien (Figuren 4a bis 4d) befinden sich auch "bifunktionelle Reagenzien", die aufgrund einer zweiten Funktion, welche zunächst geschützt ist, mehrfach zur Reaktion gebracht werden können. Beispiele für solche bifunktionellen Reagenzien sind die Phosphoramidite 4, 6, 8 bis 13. Dabei kann es sich um die multiple Konjugation eines Reagenzes oder aber um die sukzessive Reaktion mit unterschiedlichen Reagenzien handeln. So kann beispielsweise das Fluorescein-Phosphoramidit 3 nur einmal zur Reaktion gebracht werden. Dagegen besitzt das Fluorescein-Phosphoramidit 4 eine durch eine Dmt-Gruppe geschützte Hydroxyfunktion, die nach Abspaltung der Dmt-Gruppe nochmals mit einem Phosphorylierungsreagenz zur Reaktion gebracht werden kann. Auf diese Weise können ein und dieselbe Gruppe oder aber unterschiedliche Gruppen mehrfach eingeführt werden. PNA-6 ist ein Beispiel für eine Mehrfachkonjugation am Carboxyterminus und einer zusätzlichen Modifikation am Aminoterminal. Zunächst wurden am Carboxyterminus sukzessive das Fluorescein und der Aminolinker aufgebaut. Nach der Synthese des PNA-Teils wurde im letzten Zyklus ein Hydroxyethylglycin-t Baustein gekoppelt, der mit dem C16-Phosphorylierungsreagenz 7 zur Reaktion wurde. PNA-1 und PNA-2 sind Verbindungen der Formel I, die nur

carboxyterminal mit einem Phosphoryl-Rest modifiziert sind ($q = 0$). Diese Substanzklasse ist ebenfalls neu und Gegenstand der Erfindung.

In Figur 5a und 5b sind einige Beispiele von Verbindungstypen für die N-terminale Modifikation der Verbindungen der Formel I gezeigt. Verbindungstyp

- 5 A erhält man durch Reaktion der endständigen Hydroxygruppe der PNA mit dem Phosphorylierungsreagenz 1. Verbindungstyp B erhält man durch Reaktion der endständigen Aminogruppe der PNA mit dem Biotin-Phosphoramidit 5. Verbindungstyp C erhält man durch sukzessive Umsetzung der PNA mit einer endständigen Hydroxygruppe mit dem Spacer-18 Phosphoramidit 9,
- 10 Aminomodifizier-5 Phosphoramidit 12 und Lexitropsin. Verbindungstyp D erhält man durch sukzessive Umsetzung der PNA mit einer endständigen Hydroxygruppe mit dem Spacer-9 Phosphoramidit 8 und dem Cyanin-3 Phosphoramidit 10. Verbindungstyp E erhält man durch sukzessive Umsetzung der PNA mit einer endständigen Hydroxygruppe mit dem bifunktionellen
- 15 Fluorescein-Phosphoramidit 4, dem Spacer-9 Phosphoramidit 8, und dem C16-Phosphorylierungsreagenz 7. Die zusätzlich durchzuführenden Schritte, wie Oxidation und Schutzgruppenabspaltung, sind in den Beispielen beschrieben.

- Ein Beispiel für eine carboxyterminale Modifikation von PNA mit Hilfe eines
- 20 Phosphoramidits der Formel V D ist in Figur 7 dargestellt. Dabei geht man von einem Bishydroxyethylsulfon-Träger 1 (Figur 6) aus, der nach Abspaltung der Dmt-Gruppe mit 3% Trichloressigsäure mit dem Phosphoramidit der Formel V D unter Tetrazolkatalyse umgesetzt wird. Nach Oxidation mit Jodwasser spaltet man die aminoternale Mmt-Gruppe mit 3% Trichloressigsäure ab und
- 25 synthetisiert dann den PNA-Teil nach literaturbekannten Methoden, beispielsweise nach der unten erläuterten Mmt-Methode. Eine alternative Methode zur carboxyterminalen Modifikation macht von CPG-Trägern Gebrauch, die entsprechend dem einzuführenden Rest modifiziert sind, also beispielsweise den Fluorescein-Rest enthalten (Figur 8). Diese Methode soll am
- 30 Beispiel eines PNA-Derivates erläutert werden, das aminoternale mit einem Hexadecylphosphat-Rest und carboxyterminal mit einem Fluoresceinphosphat modifiziert ist. Zunächst wird der Fluorescein-Träger 3 (Figur 6) mit

Trichloressigsäure detrityliert und dann mit dem Aminomodifizier-C6
 Phosphoramidit 13 (Figur 4d) mit Hilfe von Tetrazol kondensiert. Nach Oxidation
 mit Jodwasser und Abspaltung der Mmt-Gruppe kann der PNA-Teil nach
 gängigen Methoden synthetisiert werden. Im letzten Zyklus wird ein auf
 5 Hydroxyethylglycin basierender PNA-Baustein (Formel V A, u' = 2, V' =
 Sauerstoff) gekuppelt, der nach Abspaltung der Dmt-Schutzgruppe mit Hilfe des
 C16-Phosphorylierungsreagenzes 7 wie in Figur 9 gezeigt umgesetzt wird. Nach
 Abspaltung aller Schutzgruppen und Spaltung vom CPG-Träger erhält man das
 zweifach modifizierte PNA-Derivat.

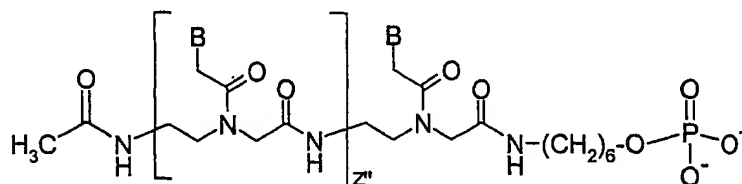
10

Beispiele:

Die Herstellung folgender Verbindungen ist exemplarisch beschrieben:

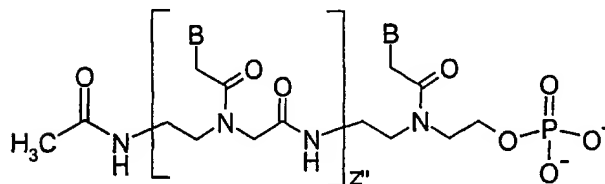
15

PNA-1:



20

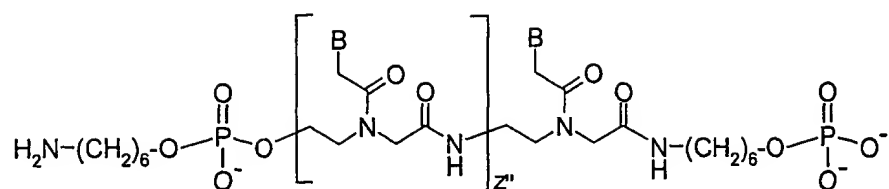
PNA-2:



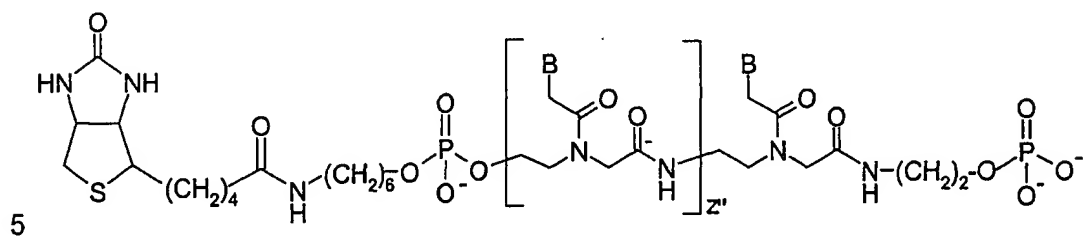
25

PNA-3:

34

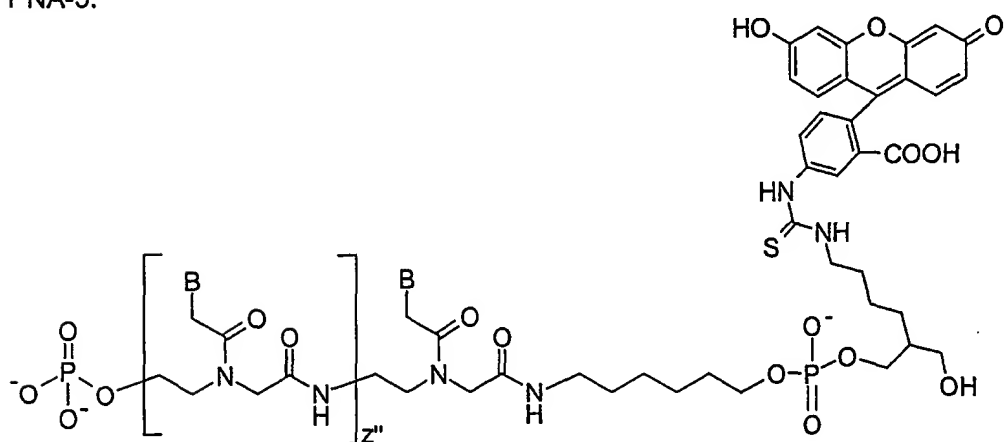


PNA-4:

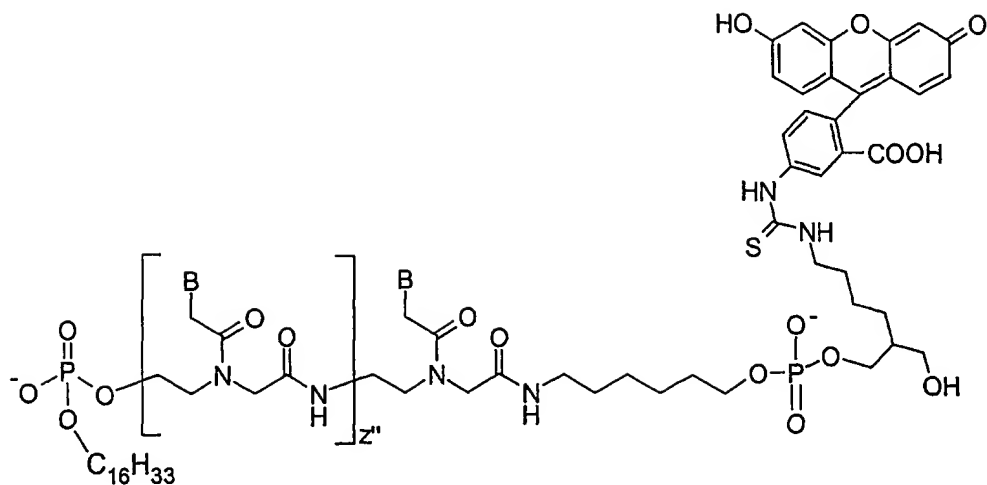


10

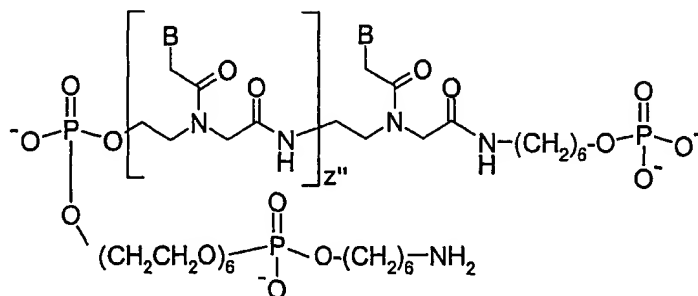
15 PNA-5:



PNA-6:



PNA-7:



5

wobei die Abfolge der Basen B jeweils durch SEQ ID NO: 53 beschrieben wird,
und z'' jeweils gleich 10 ist:

SEQ ID NO: 53 5'-T A T T C C G T C A T-3' (PNA-1 bis PNA-7)

10

Beispiel 1: Synthese der PNA-Kette

Zur Herstellung des PNA-Teils wurden die folgenden Reagenzien verwendet:

- 15 1. Phosphoramidit-Reagenz (0.1 M in Acetonitril (ACN))
2. Mmt-PNA-Monomere bzw. Dmt-oeg-PNA-Monomere (0.2 M in DMF:ACN (1:1; v:v))
3. Wasserfreies ACN (≤ 30 ppm water)

4. Trichloressigsäure (3 %) in Dichloromethan (DCM)
5. Acetanhydrid, 2,6-Lutidin in THF (1:1:8; v:v:v); (Cap A)
6. N-Methylimidazol (16 %) in THF; (Cap B)
7. Jodlösung (0.05 M) in THF, Wasser, Pyridin, (7:2:1; v:v:v)
- 5 8. Waschlösung (THF, Wasser, Pyridin (7:2:1; v:v:v))
9. Tetrazol (0.3 M) in ACN
10. HBTU; 0.2 M in DMF:ACN (1:1; v:v)
11. DIPEA; 0.2 M in DMF:ACN (1:1; v:v)
12. DMF (> 99.5 %)
- 10 13. Festphasenträger: Aminopropyl-CPG (550 Å) beladen mit Mmt-Aminohex-1-yl hemisuccinat (für PNA-hexylamide).

- Die Mmt/Acyl-geschützten bzw. Dmt/Acyl-geschützten oeg-Monomere wurden wie bereits beschrieben hergestellt (Breipohl et al. (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686). Die Beladung von Aminopropyl-CPG mit dem Mmt-Aminohex-1-yl-hemisuccinat wurde ebenfalls bereits beschrieben (Will et al. (1995) Tetrahedron 51, 12069-12082). Die derivatisierten CPG-Träger sind kommerziell erhältlich (Glen Research Corporation, Sterling, VA 20164, U.S.A.). Die PNA-Synthesen wurden im allgemeinen im Massstab von 2 to 5 µmol
- 20 durchgeführt.

Folgender Zyklus wurde zur PNA-Synthese verwendet:

1. Waschschrift mit ACN
- 25 2. Entschützung der Mmt-Gruppe bzw. Dmt-Gruppe durch Behandlung mit 3% TCA in DCM; 110 sec.
3. Waschschrift mit DMF/ACN (1:1)
4. Neutralisierung mit DIPEA in DMF/ACN (1:1)
5. Kupplung des Monomer-Bausteins durch Voraktivierung (15 min)
- 30 mit HBTU/DIPEA/PNA-Monomer (Verhältnis 1:1:1; Gesamtvolumen 450 µl)
- Beschickung der Festphase und Kupplung (45 min)
6. Waschschrift mit ACN

7. Capping mit Acetanhydrid/N-Methylimidazol
8. Waschschritt mit ACN
9. Neuer Zyklus

5 Beispiel 2: Synthese von acetyl-tat tcc gtc at-aminoethyl-p (PNA-1)

- Zunächst wird vom Bishydroxyethylsulfon-Träger 1 (1 μ mol, Figur 6) durch Behandlung mit 3% Trichloressigsäure die Dmt-Schutzgruppe abgespalten. Dann wird die freie Hydroxyfunktion mit dem Aminomodifizier-C6 Phosphoramidit
- 10 13 (Figur 4d) unter Tetrazol-Katalyse zur Reaktion gebracht. Dabei werden das Phosphorylierungsreagenz 13 im Überschuss (ca. 25-fach) als 0.3 M Lösung in Acetonitril/Tetrahydrofuran (1:1; v:v) und das Tetrazol (ca. 50-fach; 0.5 M in Acetonitril) eingesetzt. Nach erfolgter Kondensation wird mit einer Jodlösung (0.05 M in Tetrahydrofuran/ Wasser, Pyridin (7:2:1; v:v:v)) oxidiert. Danach wird
- 15 der PNA-Teil wie in Beispiel 1 beschrieben durch Festphasensynthese hergestellt. Im letzten Zyklus wird die freie Aminofunktion durch Behandlung mit dem Capping-Reagenz acetyliert. Dies verhindert bei der Entschützung mit konz. Ammoniak den aminoterminalen Abbau der PNA. Schließlich wird die PNA durch Behandlung mit konz. Ammoniak bei 50°C über Nacht vom Träger
- 20 gespalten und gleichzeitig die Schutzgruppen entfernt. Man erhält 103 OD (260) des gewünschten Rohprodukts, das durch präparative Polyacrylamid (PAA)-Gelektrophorese gereinigt wurde. Die gewünschte Produktbande wird mit 0.2M Triethylammoniumbikarbonat-Puffer eluiert und über eine Bond-Elut C18-Säule (1 g) entsalzt. Man erhält 23.3 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-
- 25 Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 3166.2; gef. 3166.8).

Beispiel 3: Synthese von acetyl-tat tcc gtc at(eo)-p (PNA-2)

- 30 Die Herstellung erfolgt analog wie in Beispiel 2 beschrieben in einer 1 μ mol Synthese. Nach Abspaltung der Dmt-Schutzgruppe des Trägers 1 (Figur 6) wird die freie Hydroxyfunktion mit dem Phosphoramidit der Formel V D unter

Tetrazol-Katalyse zur Reaktion gebracht. Dabei werden das Phosphoramidit im Überschuss (ca. 20-fach) als 0.1 M Lösung in Acetonitril/Tetrahydrofuran (1:1; v:v) und das Tetrazol (ca.- 50-fach; 0.5 M in Acetonitril) eingesetzt. Nach erfolgter Kondensation wird mit einer Jodlösung (0.05 M in Tetrahydrofuran/
5 Wasser, Pyridin (7:2:1; v:v:v)) oxidiert. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 50 OD Rohprodukt. Davon wurden 45 OD über ein 15% PAA Gel durch Elektrophorese gereinigt wird. Man erhält 13.2 OD Produkt mit dem Molekulargewicht 3052.9 (ber. 3052.9).

10 Beispiel 4: Synthese von Aminoethyl-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminoethyl-p (PNA-3)

Die Herstellung erfolgt analog wie in Beispiel 2 beschrieben in einer 1 µmol Synthese. Nach Aufbau des Carboxyterminus und Synthese des PNA-Teils wird
15 im letzten Zyklus allerdings ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Thymin als Nucleobase (oegT) gekuppelt. Nach Spaltung der Dmt-Gruppe wird die freie Hydroxyfunktion mit dem Aminomodifizier-C6 Phosphoramidit 13 (Figur 4d) unter Tetrazol-Katalyse gekuppelt und anschliessend mit Jodwasser oxidiert. Durch Behandlung mit konz. Ammoniak bei 50°C spaltet man das
20 Oligomer vom Träger und entfernt gleichzeitig alle basenlabilen Schutzgruppen. Dann wird die terminale Mmt-Schutzgruppe durch Behandlung mit 80% Essigsäure entfernt. Man erhält 130 OD des Rohproduktes, das durch Gel-Elektrophorese gereinigt wurde. Man erhält 22.5 OD Produkt mit dem Molekulargewicht 3303.8 (ber. 3305.0)

25

Beispiel 5: Synthese von Biotin-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminoethyl-p (PNA-4)

Die Herstellung erfolgt analog wie in Beispiel 2 beschrieben in einer 0.5 µmol Synthese. Nach Aufbau des Carboxyterminus und Synthese des PNA-Teils wird
30 im letzten Zyklus allerdings ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Thymin als Nucleobase (oegT) gekuppelt. Nach Spaltung der Dmt-Gruppe wird die freie Hydroxyfunktion mit dem Biotin-Phosphoramidit 5 (Figur 4b) unter

Tetrazol-Katalyse gekuppelt und anschliessend mit Jodwasser oxidiert und mit Trichloressigsäure detrityliert. Durch Behandlung mit konz. Ammoniak bei 50°C spaltet man das Oligomer vom Träger und entfernt gleichzeitig alle Schutzgruppen. Man erhält 37 OD des Rohproduktes, das durch Gel-

5 Elektrophorese gereinigt wurde. Man erhält 22.5 OD.

Beispiel 6: Synthese von p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohexyl-p-Fluorescein (PNA-5)

10 Die Synthese erfolgt analog Beispiel 2 ausgehend vom Fluorescein-Träger 3 (Figuren 6a und 8). Vom Fluorescein-Träger 3 wird durch Behandlung mit 3% Trichloressigsäure die Dmt-Schutzgruppe abgespalten. Dann wird die freie Hydroxyfunktion mit dem Aminomodifizier-C6 Phosphoramidit 13 (Figur 4d) unter Tetrazol-Katalyse zur Reaktion gebracht. Nach erfolgter Kondensation wird mit

15 einer Jodlösung (0.05 M in Tetrahydrofuran/ Wasser, Pyridin (7:2:1; v:v:v)) oxidiert. Danach wird der PNA-Teil wie in Beispiel 1 beschrieben durch Festphasensynthese hergestellt. Im letzten Zyklus wird ein auf Hydroxy-ethylglycin basierender Baustein mit Thymin als Nucleobase ((t)oeg) gekuppelt. Nach Spaltung der Dmt-Gruppe wird die freie Hydroxyfunktion mit dem

20 Phosphorylierungsreagenz 1 (Figur 4a) unter Tetrazol-Katalyse gekuppelt und anschliessend mit Jodwasser oxidiert. Schliesslich wird die PNA durch Behandlung mit konz. Ammoniak bei 50°C über Nacht vom Träger gespalten und gleichzeitig die Schutzgruppen entfernt. Man erhält 61 OD (260) des Rohprodukts, das durch präparative Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese

25 gereinigt wurde. Die gewünschte Produktbande wird mit 0.2M Triethylammoniumbikarbonat-Puffer eluiert und über eine Bond-Elut C18-Säule (1 g) entsalzt. Man erhält 5.6 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse zeigte (ber. 3709.5; gef. 3706.3)

30

Beispiel 7: Synthese von C16-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohexyl-p-Fluorescein (PNA-6)

Die Synthese erfolgt analog Beispiel 6 ausgehend von 1 μ mol Fluorescein-Träger 3 (Figuren 6a und 8). Im letzten Zyklus wurde ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Thymin als Nucleobase ((t)oeg) gekuppelt. Nach
5 Spaltung der Dmt-Gruppe wird die freie Hydroxyfunktion jedoch mit dem C16-Phosphorylierungsreagenz 7 (Figur 4c) unter Tetrazol-Katalyse gekuppelt und anschliessend mit Jodwasser oxidiert. Schliesslich wird die PNA durch Behandlung mit konz. Ammoniak bei 50°C über Nacht vom Träger gespalten und gleichzeitig die Schutzgruppen entfernt. Man erhält 61 OD (260) des
10 gewünschten Rohprodukts, das durch präparative Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese gereinigt wurde. Die gewünschte Produktbande wird mit 0.2M Triethylammoniumbikarbonat-Puffer eluiert und über eine Bond-Elut C18-Säule (1 g) entsalzt. Man erhält 4.6 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse zeigte (ber.
15 3934, gef. 3931).

Beispiel 8: Bestimmung der Schmelztemperaturen

Die Bestimmung der Schmelztemperaturen erfolgte mit Hilfe eines HP 8452A
20 Diodenarray-Spektrophotometers, eines HP 89090A Peltier-Elements und der HP Temperature Control Software Rev. B5.1 (Fa. Hewlett Packard). Es wird in 0.5°C/min Schritten in 140 mM KCl, 10 mM Natriumdihydrogenphosphat, 0.1mM EDTA (pH 7.4) als Puffer gemessen. Die Oligomerkonzentration beträgt 0.5 bis 1 OD₂₆₀ pro ml.

25

Überraschenderweise zeigten die zweifach phosphorylmodifizierten PNA-5 und PNA-6 Derivate mit zwei bzw. drei negativen Ladungen eine gleich gute oder bessere Bindung gegenüber komplementärer DNA und RNA wie die ungeladene PNA (Referenzsubstanz).

30

PNA-Derivat	T _m (DNA)	T _m (RNA)
-------------	----------------------	----------------------

Referenz	Ac-HN-tat tcc gtc at-hex	41.9 °C	56.6 °C
PNA-5	p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohexyl-p-Fluorescein	41.8 °C	56.9 °C
PNA-6	C16-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohexyl-p-Fluorescein	44.1 °C	56.9 °C

Beispiel 9: Bestimmung der Zellaufnahme nach Fluoreszenz-Markierung

- 5 Man läßt die COS-Zellen bis zur Konfluenz in Dulbecco's MEM, das mit 10 % FCS supplementiert wurde, in 5 cm Petrischalen heranwachsen. Die Zellen werden zweimal mit serumfreien DMEM gewaschen. Mit Hilfe einer sterilen Nadel wird eine Fläche von ca. 1 cm² in der Mitte der Petrischale eingekratzt. In diese Fläche wird die zu untersuchende PNA-Lösung (10 µM) aufgebracht. Es
- 10 wird bei 37 °C unter CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach 2, 4 und 16 Stunden werden die Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu werden die Zellen viermal mit serumfreien DMEM gewaschen, mit einem Glasträger abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop bzw. durch Phasenkontrast bewertet. PNA-5 und PNA-6 wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht.
- 15 Dabei zeigte sich, dass das Hexadecyl-PNA-Derivat (PNA-6) effizienter in die Zellen aufgenommen wurde als die PNA ohne Hexadecyl-Rest.

Beispiel 10: Hemmung der Zellproliferation durch PNA-6

- 20 Die Sequenz von PNA-6 ist gegen den Translationsstart der Ha-ras mRNA gerichtet. Die REH Zellen (human pre-B leukemia cells, DSM ACC 22) oder A549 Tumor zellen wurden in OptiMEM (Gibco BRL) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, GIBCO-BRL) bei 37°C unter 5% CO₂ kultiviert. Die
- 25 Zelldichte für den Assay war ca. 1 x 10⁶ / ml). Die PNA-6 (10 µM) wurde mit den Zellen in 24-well Platten inkubiert. Nach 96 Inkubation bei 37°C unter 5% CO₂ wurde die Zelldichte bestimmt. Mittelwerte der Zelldichte wurden aus 3

individuellen Löchern einer PNA Konzentration ermittelt. Es zeigte sich, dass PNA-13 die Proliferation der REH Zellen hemmt. Nach > 4 Tagen Inkubationszeit ist die Hemmung durch PNA-6 stärker als durch ein entsprechendes Phosphorothioat-Oligonucleotid.

5

Beispiel 11: Synthese von Aminoethyl-p-spacer18-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminoethyl-p (PNA-7)

- Die Herstellung erfolgt analog wie in Beispiel 2 beschrieben in einer 1 µmol
- 10 Synthese. Nach Aufbau des Carboxyterminus und Synthese des PNA-Teils wird im letzten Zyklus allerdings ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Thymin als Nucleobase (oegT) gekuppelt. Nach Spaltung der Dmt-Gruppe wird die freie Hydroxyfunktion mit dem Spacer18 Phosphoramidit (Figur 4c) und nach nochmaliger Detritylierung mit dem Aminomodifier-C6 Phosphoramidit 13
- 15 (Figur 4d) unter Tetrazol-Katalyse gekuppelt und anschliessend mit Jodwasser oxidiert. Durch Behandlung mit konz. Ammoniak bei 50°C spaltet man das Oligomer vom Träger und entfernt gleichzeitig alle basenlabilen Schutzgruppen. Dann wird die terminale Mmt-Schutzgruppe durch Behandlung mit 80% Essigsäure entfernt. Man erhält 57 OD des Rohproduktes, das durch Gel-
- 20 Elektrophorese gereinigt wurde. Man erhält 7.4 OD Produkt, das im Massenspektrum das erwartete Molekulargewicht 3647.5 (ber. 3648.5) zeigt.

Abkürzungsverzeichnis:

25

ACN	Acetonitril
BOC	tert-Butyloxycarbonyl
<u>C</u> , <u>c</u>	pseudo-iso-Cytosin
COS	CV1 Origin SV 40
CPG	controlled pore glass
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin

DMEM	Dulbecco's MEM
DMF	Dimethylformamid
Dmt	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dinitroaryl
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
hex	-NH-(CH ₂) ₆ -OH
MEM	Modified Eagle's minimal essential medium
Mmt	Monomethoxytrityl
OD	Optische Dichte
oeg	N-(2-Hydroxyethyl)glycin
PAA	Polyacrylamid
PG	Schutzgruppe
PNA	Polyamidnukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TCA	Trichloressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TR	säurelabile Schutzgruppe

Figuren 1a, 1b, 2b und 3b zeigen Beispiele für endständige Reste Z und Z'.

Figuren 2a und 3a zeigen Beispiele für verbrückende Reste X und X'.

5

Figuren 4a, 4b, 4c und 4d zeigen Beispiele für Phosphorylierungsreagenzien.

Figuren 5a und 5b zeigen Beispiele für die einfache (A, B) und multiple

(C bis E) Derivatisierung am N-Terminus von PNA.

Figur 6 zeigt Beispiele für Träger-gebundene Reagenzien für die Festphasensynthese.

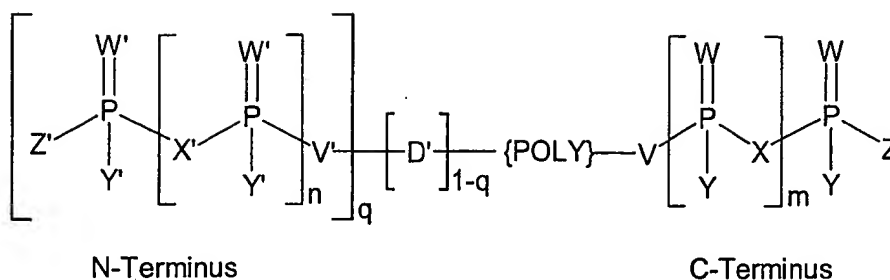
5

Figuren 7, 8 und 9 zeigen Beispiele für die Synthese C- und N-terminal modifizierter PNA.

Patentansprüche:

1. PNA-Derivat, das am C-Terminus oder am C- und N-Terminus des PNA-Rückgrates einen oder mehrere Phosphoryl-Reste trägt, wobei neben Oxo-
5 auch Thio- und Imino-Phosphorylreste umfasst sind, und wobei mindestens einer der Phosphoryl-Reste eine oder mehrere deprotonierbare Gruppen, vorzugsweise Hydroxy- oder Mercapto-Gruppen trägt, und die Phosphoryl-Reste über eine Sauerstoff-Phosphor, eine Schwefel-Phosphor oder eine Stickstoff-Phosphor-Bindung entweder direkt oder über einen Spacer mit
10 dem PNA-Rückgrat verknüpft sind.
2. PNA-Derivat gemäß Anspruch 1, wobei der Spacer beispielsweise ein Alkanoylamid, ein Poly(alkoxy)carboxamid oder eine Aminosäure sein kann, und wobei mindestens einer der Phosphoryl-Reste eine oder mehrere
15 Hydroxy- oder Mercapto-Gruppe trägt, die in einem pH-Bereich von 4,5 bis 14, vorzugsweise 6,5 bis 12, besonders bevorzugt 6,5 bis 9 deprotonierbar ist, und wobei ferner der Phosphoryl-Rest beispielsweise ein Phosphat, ein Phosphonat, ein Thiophosphat, ein Phosphoamidat oder ein substituierter Phosphoryl-Rest ist, und wobei substituierte Phosphoryl-Reste
20 gegebenenfalls eine oder mehrere Markergruppen, oder Gruppen zur Quervernetzung, oder Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, oder Gruppen, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigern, tragen.
- 25 3. PNA-Derivat der Formel I

46



Formel I

wobei

q gleich 0 oder 1 ist,

5

D' gleich Hydroxy, Mercapto, Amino, Alkylamino oder Acylamino ist,

V unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel, NR₁ ist,

10

V' unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel, NR₁, eine Gruppe U-(CR₃R₄)_{U'}-C(O)-NH oder eine Gruppe U-(CH₂CH₂O)_{U'}-CH₂-C(O)-NH ist,

U unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel oder NH ist,

15

u' unabhängig voneinander gleich 1 bis 10 ist, vorzugsweise 1 bis 4, besonders bevorzugt 1,

W und W' unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel oder NR₁ sind,

20

Y und Y' unabhängig voneinander gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion, Thioat oder NR₁R₂ sind,

- X und X' unabhängig voneinander gleich eine Gruppe U-(C₂-C₂₂-Alkandyl)-U oder eine Gruppe U-(CH₂CH₂-O)_u' ist,
 oder gleich eine Markergruppe, oder eine Gruppe zur
 Quervernetzung, oder eine Gruppe, die die intrazelluläre
 Aufnahme begünstigt, oder eine Gruppe, die die Bindungs-
 affinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigert, ist,
 beispielsweise ein bifunktionseller Fluorescein-, Rhodamin-,
 TAMRA-, Biotin-, Pyren-, Dinitrophenyl-, Cholesteryl-, Acridin-,
 Adamantyl-, Vitamin E-, Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Edans-,
 Lexitropsin-, Psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- oder
 Digoxigenin-Rest,
- Z und Z' unabhängig voneinander gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion,
 Thioat oder NR₁R₂, C₁-C₂₂-Alkyl, C₁-C₈-Arylalkyl, C₁-C₂₂-
 Alkyl-U, C₁-C₈-Arylalkyl-U, Hydroxy-C₁-C₁₈-U, Aminoalkyl-U,
 Mercaptoalkyl-U ist,
 oder eine Gruppe der Formel R₇(CH₂CH₂-O)_m ist, wobei R₇
 gleich Hydroxy, Amino oder C₁-C₂₂-Alkoxy und m gleich 1 bis
 100 ist, vorzugsweise 2 bis 10,
 oder gleich eine Markergruppe, oder eine Gruppe zur
 Quervernetzung, oder eine Gruppe, die die intrazelluläre
 Aufnahme begünstigt, oder eine Gruppe, die die Bindungs-
 affinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigert, ist,
 beispielsweise ein monofunktionseller oder bifunktionseller
 Fluorescein-, Rhodamin-, TAMRA-, Biotin-, Pyren-,
 Dinitrophenyl-, Cholesteryl-, Acridin-, Adamantyl-, Vitamin E-,
 Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Edans-, Lexitropsin-, Psoralen-,
 BODIPY-, ROX-, R6G- oder Digoxigenin-Rest,

R_1 und R_2 unabhängig voneinander ein Rest bestehend aus Wasserstoff oder C_1 - C_6 -Alkyl bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff,

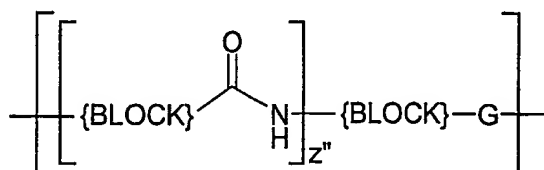
5 R_3 und R_4 unabhängig voneinander ein Rest bestehend aus Wasserstoff oder C_1 - C_6 -Alkyl oder den Rest einer Aminosäure-Seitenkette bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff, wobei benachbarte Reste R_3 und R_4 in V' auch einen C_5 - C_8 -Cycloalkyl-Ring bilden können,

10

n gleich 0 bis 10 ist, vorzugsweise 0 bis 3,

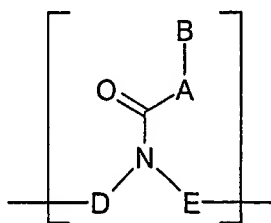
m gleich 0 bis 10 ist, vorzugsweise 0 bis 3,

15 und wobei {POLY} beschrieben durch die Formel II wird,



Formel II

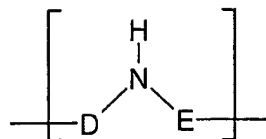
wobei ferner {BLOCK} unabhängig voneinander eine Gruppe ist ausgewählt
20 aus Formel IIIA,



Formel III A

25

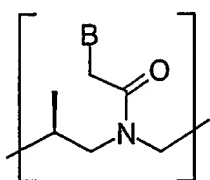
oder aus Formel IIIB,



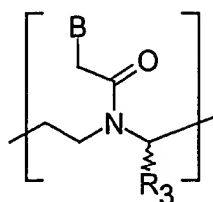
Formel III B

5

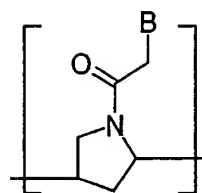
oder aus den Formeln IV A bis IV G,



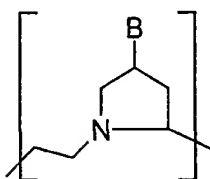
Formel IV A



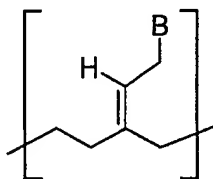
Formel IV B



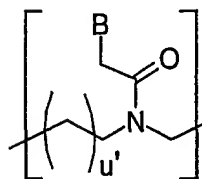
Formel IV C



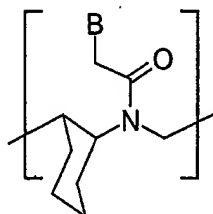
Formel IV D



Formel IV E



Formel IV F



Formel IV G

wobei jeder Baustein {BLOCK} verschieden sein kann,

10

und ferner gilt, dass

z'' gleich 0 bis 100 ist, vorzugsweise 1-20, besonders bevorzugt 4-15,

- G ausgewählt wird aus den Gruppen $(CR_5R_6)_{u'}$, $C(O)NH-(CR_1R_2)_{t'}$ oder $C(O)NH-(CH_2CH_2O)_{u'}$ - CH_2CH_2 ist, wobei t' gleich 2 bis 10 ist, vorzugsweise 6,
- 5 A unabhängig voneinander eine Gruppe $(CR_1R_2)_s$ ist, wobei s gleich 1 bis 3 ist, vorzugsweise 1,
- 10 B unabhängig voneinander entweder ein aromatischer Rest, der auch heteroaromatischen Charakter besitzen kann, oder Wasserstoff, oder Hydroxy oder C_1 - C_{18} -Alkyl ist, oder eine in der Nucleotidchemie übliche natürlich vorkommende oder eine nicht natürlich vorkommende Nucleobase oder deren Prodrugform ist,
- 15 D unabhängig voneinander eine Gruppe $(CR_3R_4)_t$ ist, wobei t gleich 2 bis 10 ist, vorzugsweise 2 bis 4, besonders bevorzugt 2,
- 20 E unabhängig voneinander eine Gruppe $(CR_5R_6)_{u'}$ ist, wobei benachbarte Reste R_5 und R_6 auch einen C_5 - C_8 -Cycloalkyl-Ring oder eine Spiroverbindung bilden können,
- 25 R_5 und R_6 unabhängig voneinander einen Rest bestehend aus Wasserstoff oder C_1 - C_6 -Alkyl oder den Rest einer Aminosäure-Seitenkette bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff,
- und wobei u' , R_1 , R_2 , R_3 und R_4 die gleiche Bedeutung wie oben beschrieben haben,
- 30 sowie physiologisch verträglichen Salze des PNA-Derivates der Formel I,

mit den Massgaben, dass mindestens ein Rest Y, Y', Z oder Z' gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion oder Thioat ist, und dass mindestens ein Rest B eine Nucleobase ist.

- 5 4. PNA-Derivat nach Anspruch 3, wobei mindestens ein Rest Y, Y', Z oder Z' in Formel I in einem pH-Bereich von 4,5 bis 14, vorzugsweise 6,5 bis 12, besonders bevorzugt 6,5 bis 9 gleich Oxyanion oder Thioat ist.
5. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 4, wobei n und m unabhängig
10 voneinander gleich 0 sind.
6. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei q gleich 1 ist.
7. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 6, wobei W und W' gleich Oxo
15 sind.
8. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 7, wobei Y und Y' gleich Hydroxy oder Oxyanion sind.
- 20 9. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 8, wobei V und V' gleich Oxy sind.
10. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 9, wobei X und X' unabhängig voneinander gleich eine Gruppe U-(C₂-C₂₂-Alkandiy)-U, bevorzugt O-(C₂-C₂₂-Alkandiy)-O, besonders bevorzugt O-(CH₂)₂₋₆O
25 sind,
oder gleich eine Gruppe U-(CH₂CH₂-O)_{u'}, bevorzugt O(CH₂CH₂-O)_{u'}, wobei u' 1 bis 6 ist.
- 30 11. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 10, wobei X, X', Z und Z' unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe Fluorescein, Rhodamin, TAMRA oder Cyanin-Farbstoff, Biotin, Dabcyl, Psoralen,

Acridin, DNP, Cholesterol, Vitamin E-, Dabcyl-, Edans-, Lexitropsin-,
Psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- oder Digoxigenin.

12. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 11, wobei X, X', Z und Z'
5 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe
Monophosphat, Biotin-Derivat und Fluoreszein-Derivat.
13. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 11, wobei Z ein Fluoreszenz-
Marker ist und Z' ein Quencher.
- 10 14. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 11, wobei Z ein Quencher ist
und Z' ein Fluoreszenz-Marker.
- 15 15. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 11, wobei Z und Z'
unabhängig voneinander ein C₁-C₂₂-Alkyl-Rest sind,
oder ein C₁-C₂₂-U-Rest, bevorzugt ein C₁-C₂₂-Alkoxy-Rest, besonders
bevorzugt C₁₆-Alkoxy,
oder Hydroxy-C₁-C₁₈-U, bevorzugt Hydroxy-C₁-C₁₈-O, besonders
bevorzugt HO-(CH₂)₃₋₁₂O,
20 oder ein Aminoalkyl-U-Rest, bevorzugt ein Aminoalkoxy-Rest, besonders
bevorzugt 6-Aminohexoxy oder 5-Aminopentoxy,
oder eine Gruppe der Formel R₇-(CH₂CH₂-O)_m ist, wobei R₇ bevorzugt
OH oder NH₂ ist und m gleich 1 bis 6 ist, besonders bevorzugt
HO(CH₂CH₂-O)₂, HO(CH₂CH₂-O)₆ und H₂N-(CH₂CH₂-O)₂,
25 oder ein Mercaptoalkyl-V-Rest, bevorzugt ein Mercaptoalkoxy-Rest,
besonders bevorzugt 6-Mercaptohexyloxy.
16. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei q gleich 0 ist.
- 30 17. PNA-Derivat nach Anspruch 16, wobei D' gleich Acylamino ist,
vorzugsweise Acetylamino.

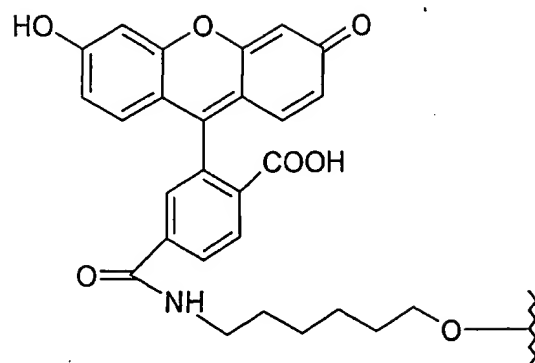
18. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 17, wobei D gleich $(\text{CH}_2)_t$, bevorzugt $(\text{CH}_2)_2$ ist.
- 5 19. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 18, wobei A, E und G gleich CH_2 sind.
20. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 19, wobei B gleich Adenin, Cytosin, 5-Methylcytosin, Guanin, Thymin und Uracil, oder gleich Purin, 2,6-
10 Diaminopurin, N^4N^4 -Ethanocytosin, N^6N^6 -Ethano-2,6-diaminopurin, 5-(C_3 - C_6)-Alkynyl-uracil, 5-(C_3 - C_6)-Alkynyl-cytosin, 5-(1-Propargylamino)-uracil, 5-(1-Propargylamino)-cytosin, Phenoxazin, 9-Aminoethoxyphenoxazin, 5-Fluor-uracil oder Pseudoisocytosin, 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil, Pseudouracil, Dihydrouracil, 5-(C_1 - C_6)-Alkyl-uracil, 5-(C_1 - C_6)-Alkyl-cytosin,
15 5-(C_2 - C_6)-Alkenyl-cytosin, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, 8-Azapurin, oder ein 7-Deaza-7-substituiertes Purin ist.
21. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 20, wobei die Basensequenz
20 gegen Teile von Tumorsupressor-Genen, Onkogenen oder Telomerasen oder deren Transkriptions-Produkte gerichtet ist.
22. PNA-Derivat nach Anspruch 21, wobei die Basensequenz des PNA-Teils
25 gegen den Translationsstart von HA-ras mRNA gerichtet ist.
23. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1-12 oder 15-22 zur Verwendung
als Arzneimittel.
24. Verwendung eines PNA-Derivates nach einem der Ansprüche 1-12 oder
30 15-22 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Tumorthherapie.

25. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Verwendung als Diagnostikum.
- 5 26. Verwendung eines PNA-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zum Nachweis von Mikroorganismen und/oder Viren.
27. Verwendung eines PNA-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zum Nachweis und/oder Quantifizierung von Nukleinsäuren.
- 10 28. Verwendung eines PNA-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 22 als Nachweisreagenz für die in-situ- oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.
29. Verwendung eines PNA-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 22 als Antisense-, Anti-Gen-, Decoy-, oder Chimperaplast-Agenz.
- 15 30. Verwendung eines PNA-Derivates nach einem der Ansprüche 13 oder 14 als Molecular Beacon.
- 20 31. Nachweisreagenz enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 22.
32. PNA-Chip, enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 22.
- 25 33. Biosensor enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 22.
34. Arzneimittel, enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1-12 oder 15-22 und gegebenenfalls weitere pharmakologisch verträgliche Zusatz- und/oder Trägerstoffe.
- 30 35. Antisense-, Anti-Gen-, Decoy-, oder Chimperaplast-Agenz, enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 22.

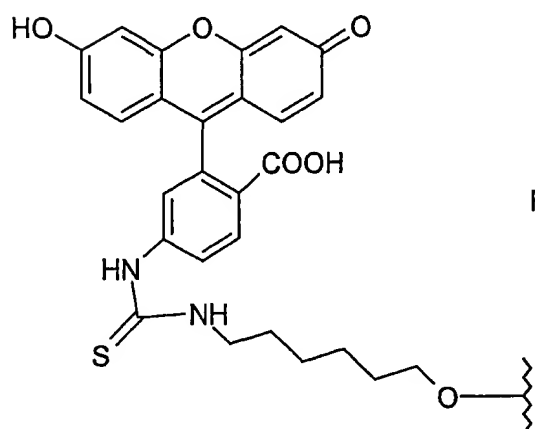
36. Verfahren zur Herstellung eines PNA-Derivats der Formel I, wobei
- a) der C-Terminus einer Amidnukleinsäure mit einem festphasen-
gebundenen Phosphorylierungs-Reagenz verknüpft wird, oder eine mit
5 C-terminal phosphorylierte Amidnukleinsäure an einen festen Träger
gebunden wird,
 - b) das Rückgrat des PNA-Oligomers durch sequentiell durch Kupplung
mit Amidonukleinsäure-Monomeren verlängert wird,
 - c) gegebenenfalls am N-Terminus mit einem Phosphorylierungsreagenz
10 umgesetzt wird.
37. Verfahren nach Anspruch 36, wobei die PNA unter Verwendung der
Schutzgruppen t-Butyloxycarbonyl (BOC), 9-Fluorenylmethoxycarbonyl
(Fmoc) oder Monomethoxytrityl (Mmt) hergestellt wird.
15
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 oder 37, wobei die PNA unter
Verwendung von festen Trägern hergestellt wird.
39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei als fester Träger CPG, Tentagel oder
20 Aminomethylpolystyren verwendet wird.
40. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, wobei
- a) ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1-12 oder 15-22
hergestellt wird, und
 - 25 b) gegebenenfalls mit weiteren pharmakologisch verträglichen Zusatz-
und/oder Trägerstoffen versetzt wird.
41. Verfahren zur Herstellung eines PNA-Chips, wobei ein PNA-Derivat nach
einem der Ansprüche 1 bis 22 entweder zuerst hergestellt und dann auf
30 einem festen Träger fixiert wird, oder das PNA-Derivat direkt auf dem
Träger hergestellt wird.

42. Verfahren zur Herstellung eines PNA-Derivats der Formel I gemäß Anspruch 36 bis 39, ferner dadurch gekennzeichnet, dass die PNA unter Ausnutzung des sauren Charakters des Phosphorrestes mittels Chromatographie oder Elektrophorese aufgereinigt wird.
- 5
43. Verfahren nach Anspruch 42, wobei das PNA-Derivat durch Chromatographie mittels einer basischen stationären Phase und eines Gradienten eines sauren oder salzhaltigen Eluent gereinigt werden.
- 10 44. Verfahren nach Anspruch 43, wobei die stationäre Phase ein Anionenaustauscher oder eine Mixed-Mode-Phase ist.

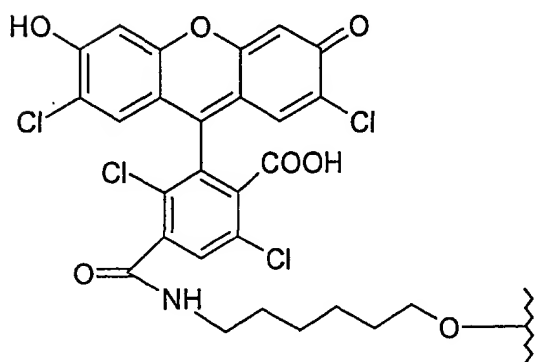
Fig. 1a:



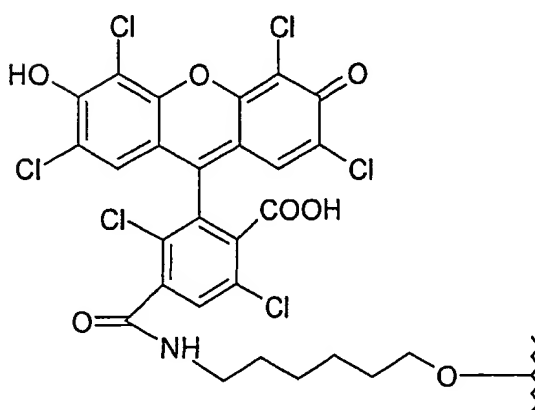
Fluorescein (Amid)



Fluorescein (Thioharnstoff)



Tetrachlorofluorescein



Hexachlorofluorescein

Fig. 1b:

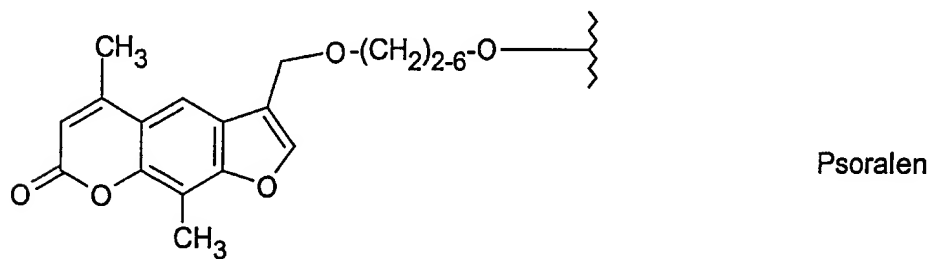
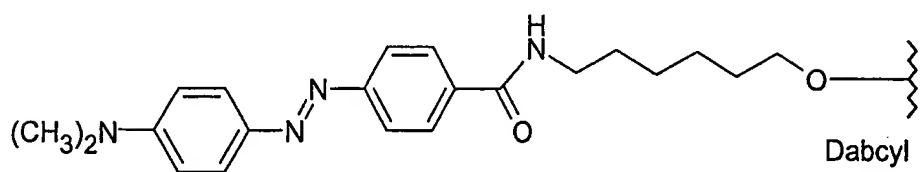
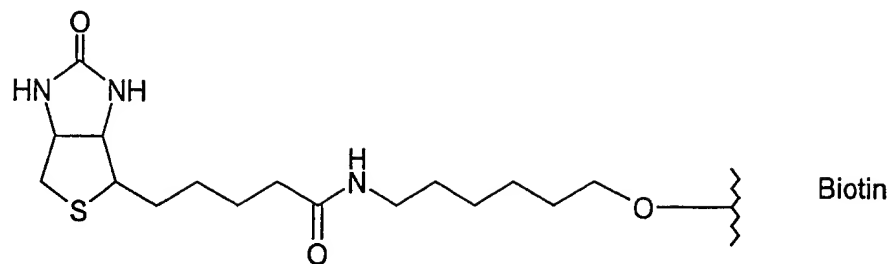
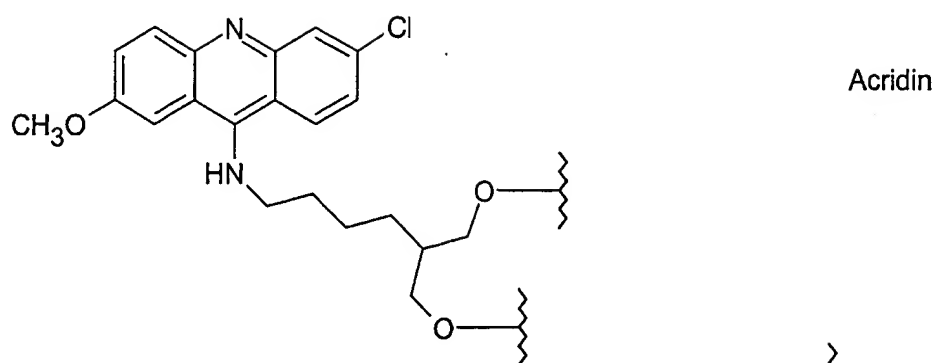
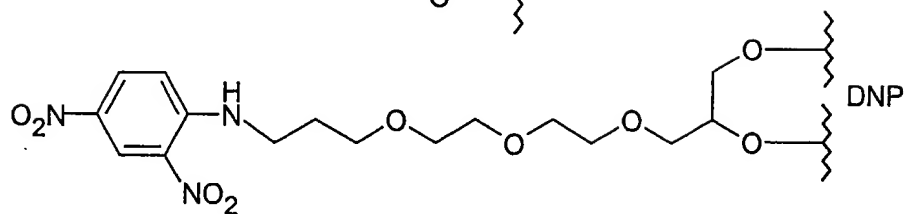


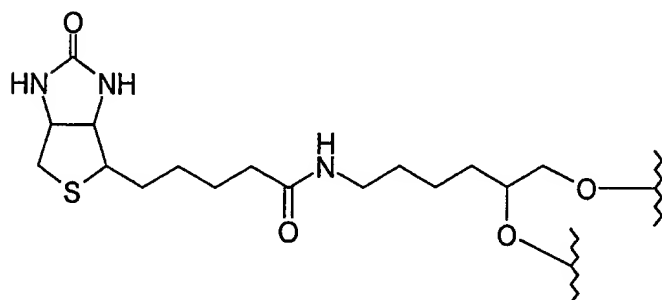
Fig. 2a:



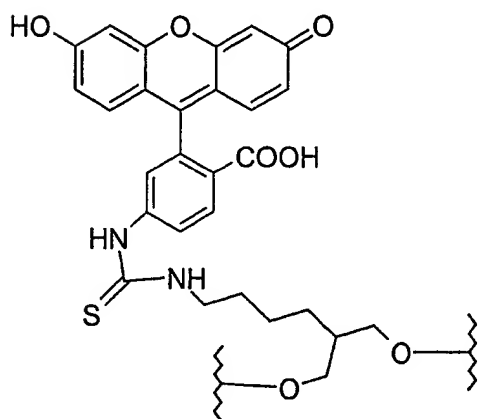
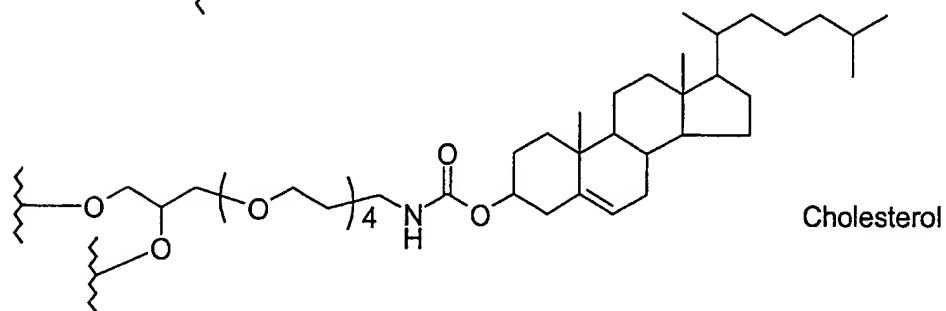
Acridin



DNP

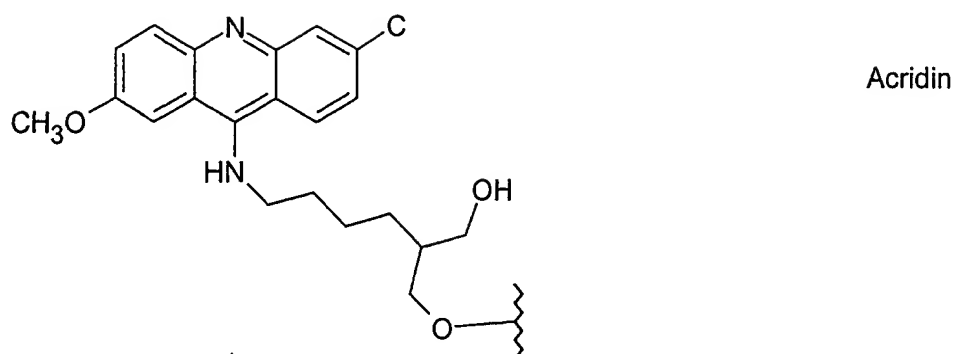


Biotin

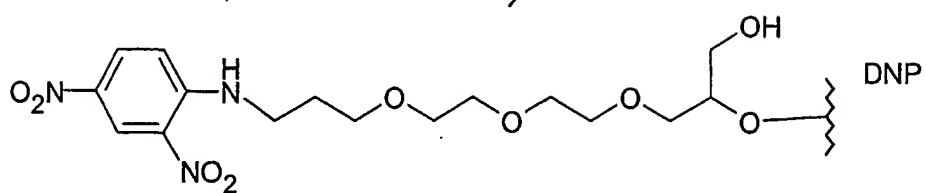
Fluorescein
(Thioharnstoff)

Cholesterol

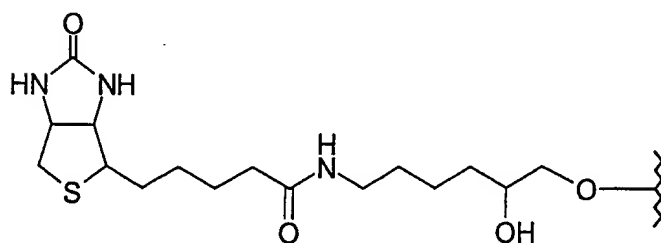
Fig. 2b:



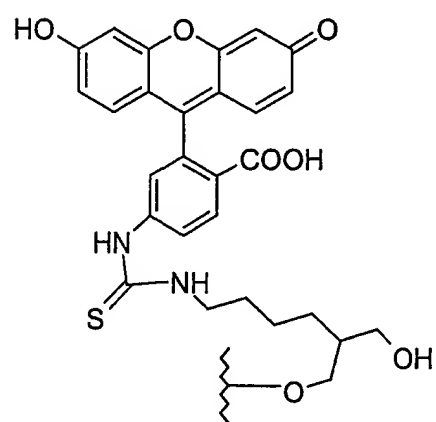
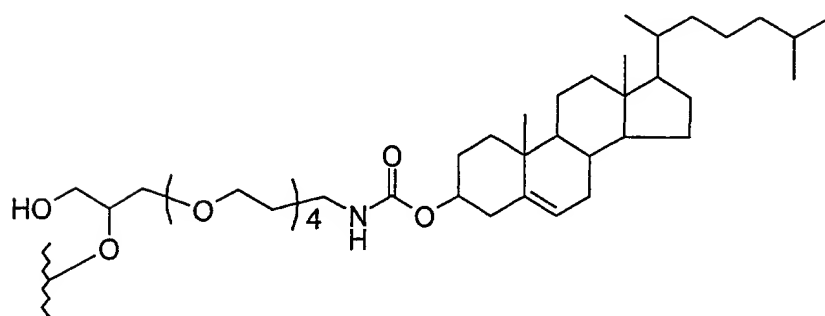
Acridin



DNP



Biotin

Fluorescein
(Thioharnstoff)

Cholesterol

Fig. 3a:

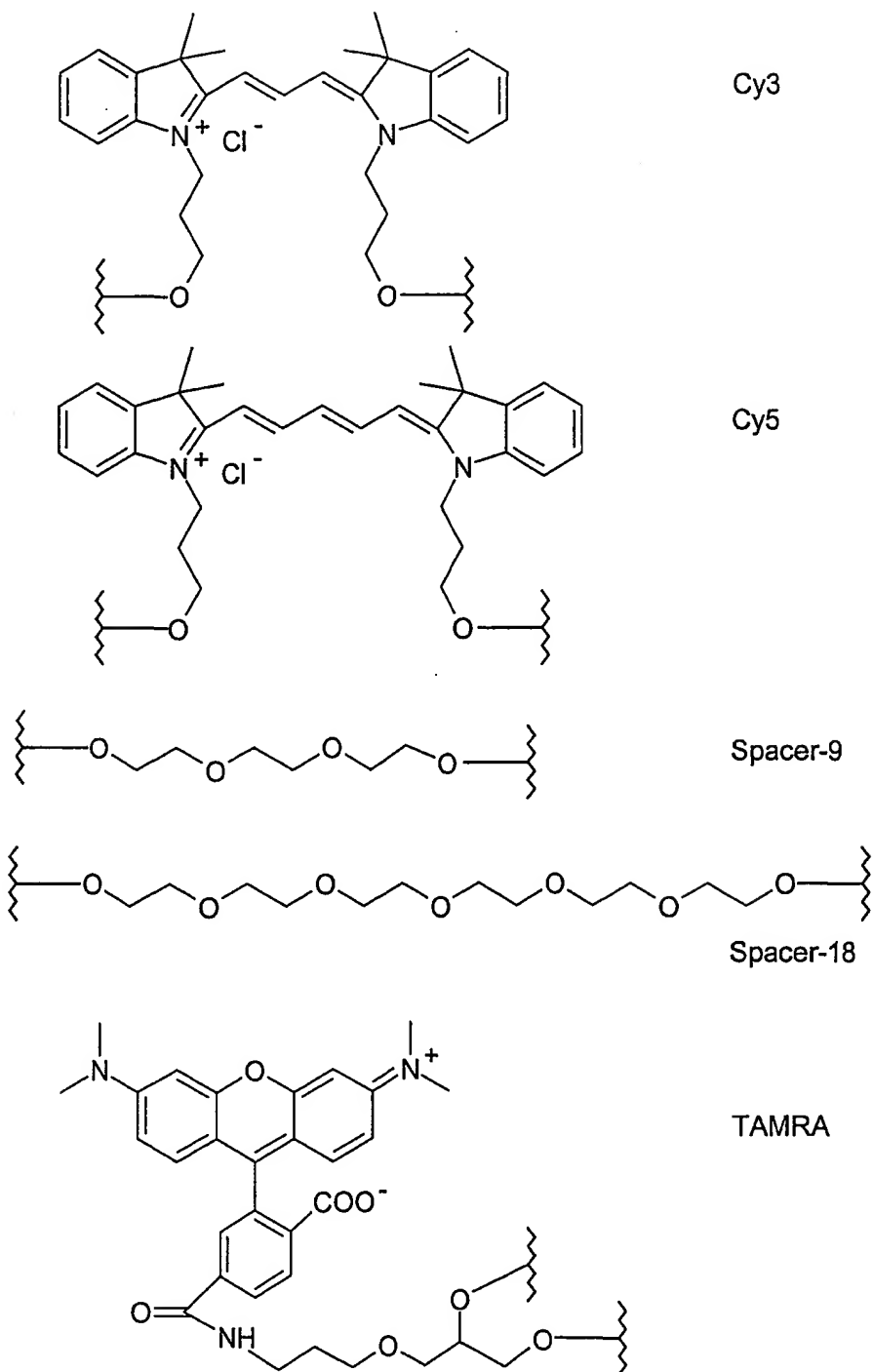


Fig. 3b:

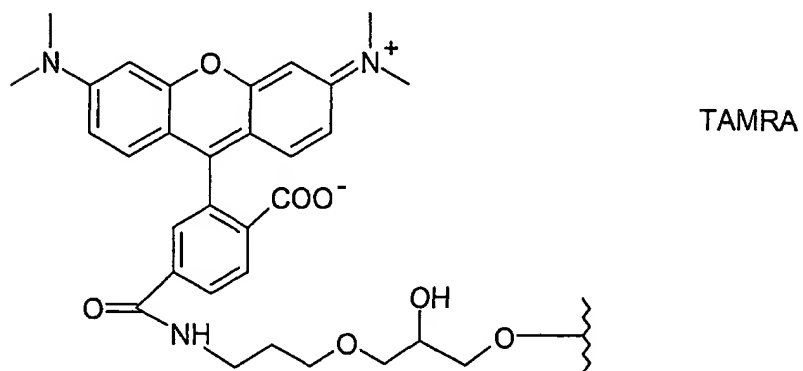
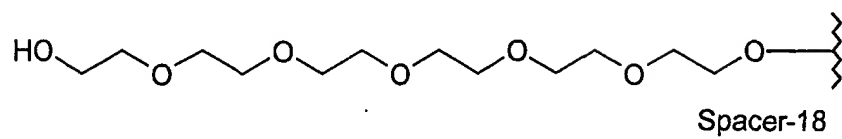
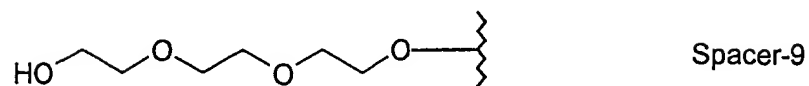
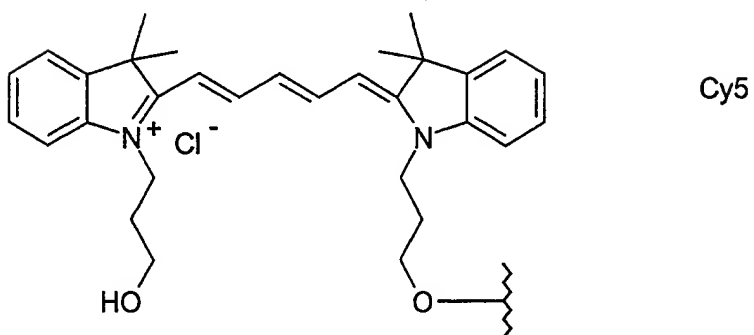
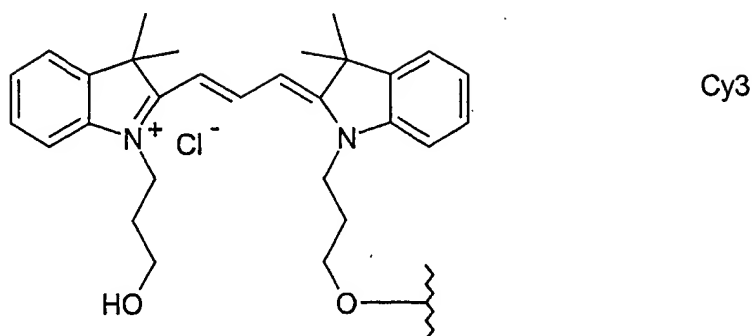
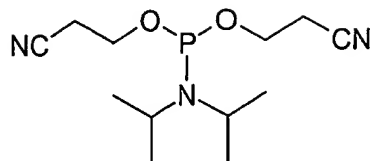
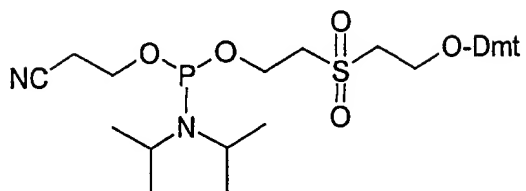


Fig. 4a:



Phosphorylierungsreagenz 1



Phosphorylierungsreagenz 2

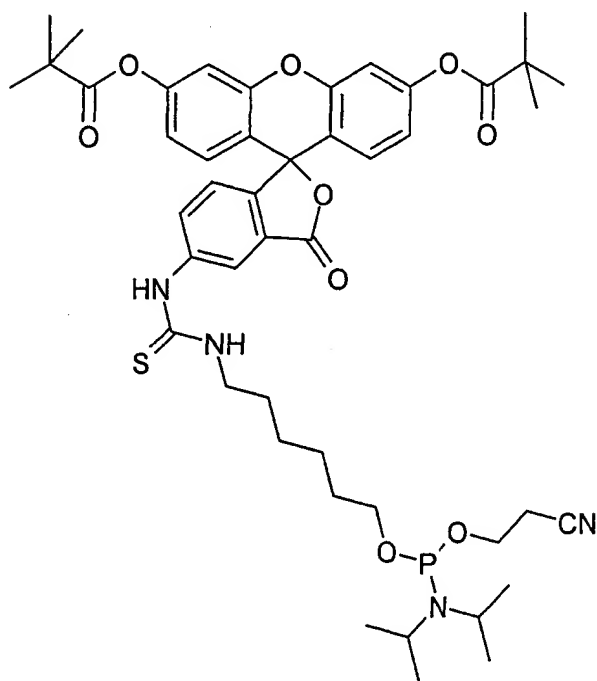
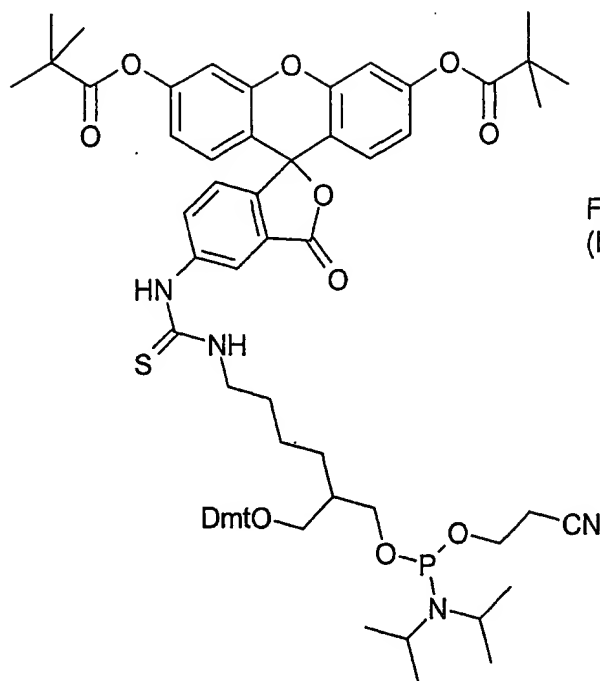
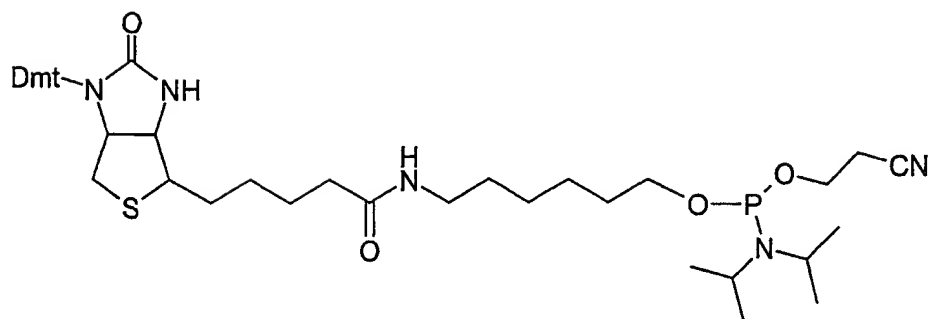
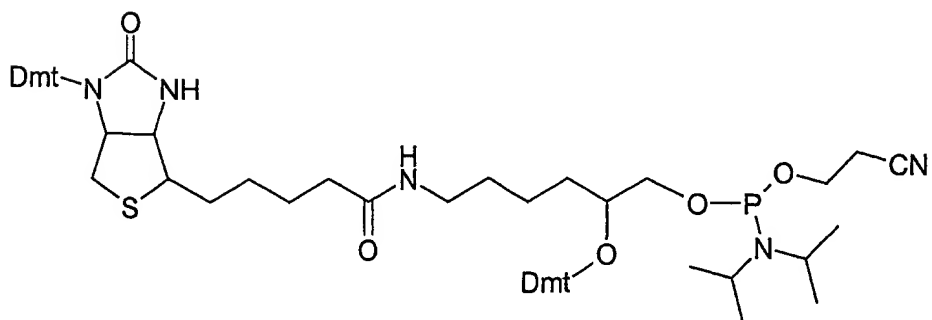
Fluorescein-Phosphoramidit 3
(monofunktionell)

Fig. 4b:

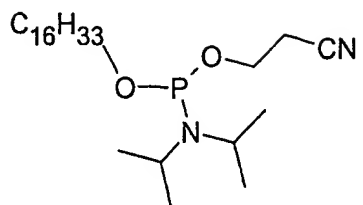
Fluorescein-Phosphoramidit 4
(bifunktionell)

Biotin-Phosphoramidit 5 (monofunktionell)

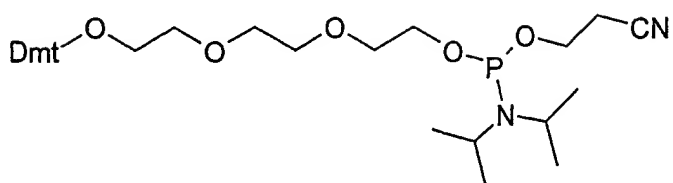


Biotin-Phosphoramidit 6 (bifunktionell)

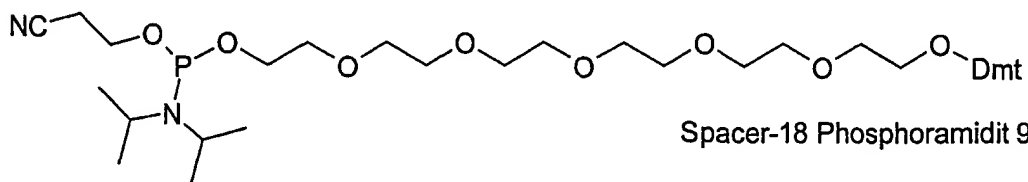
Fig. 4c:



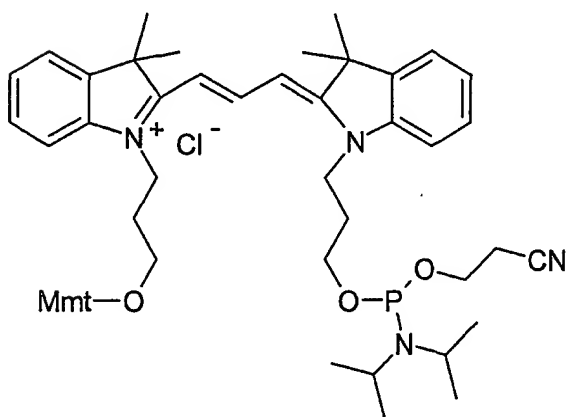
C16-Phosphorylierungsreagenz 7



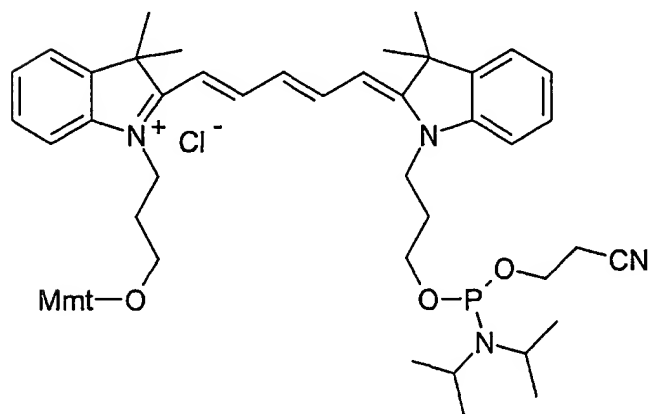
Spacer-9 Phosphoramidit 8



Spacer-18 Phosphoramidit 9

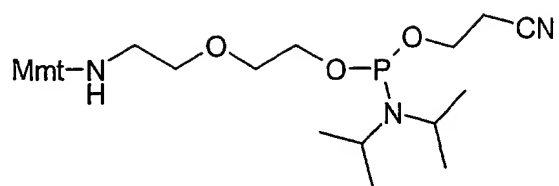


Cyanin-3 Phosphoramidit 10

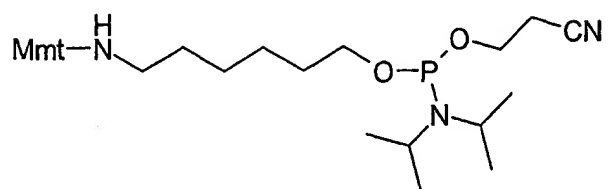


Cyanin-5 Phosphoramidit 11

Fig. 4d:



Aminomodifier-5
Phosphoramidit 12



Aminomodifier-C6
Phosphoramidit 13

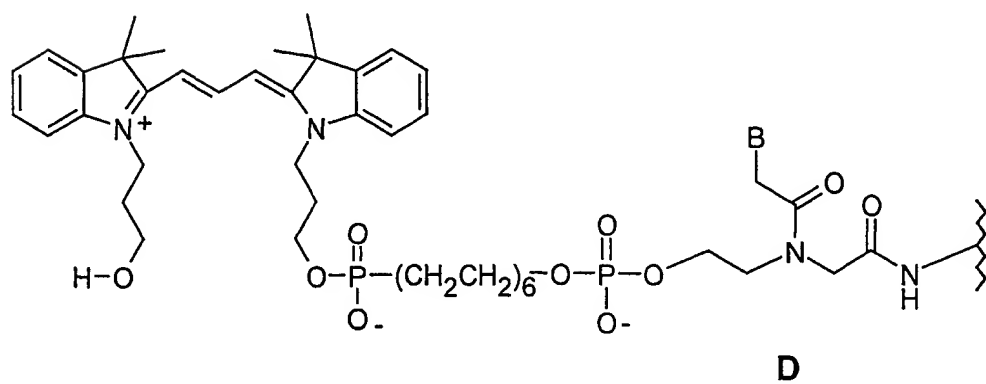
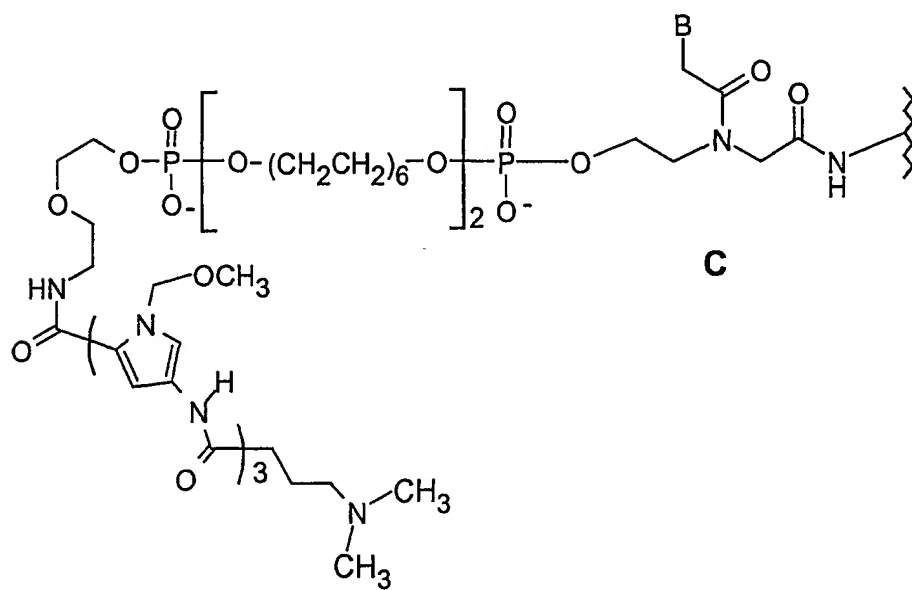
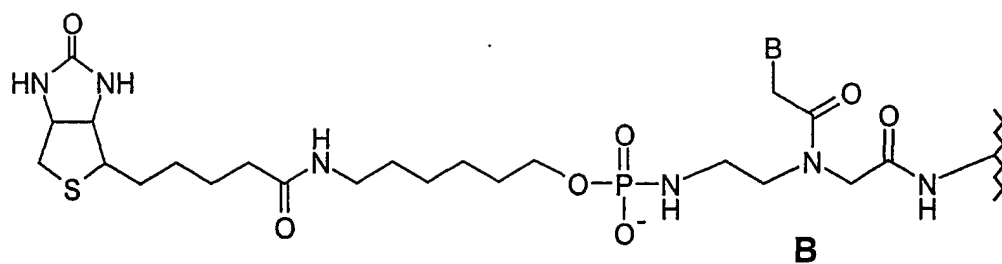
[O-]P(=O)([O-])OCCN(CC(=O)N*)CC(=O)O

Fig. 5b:

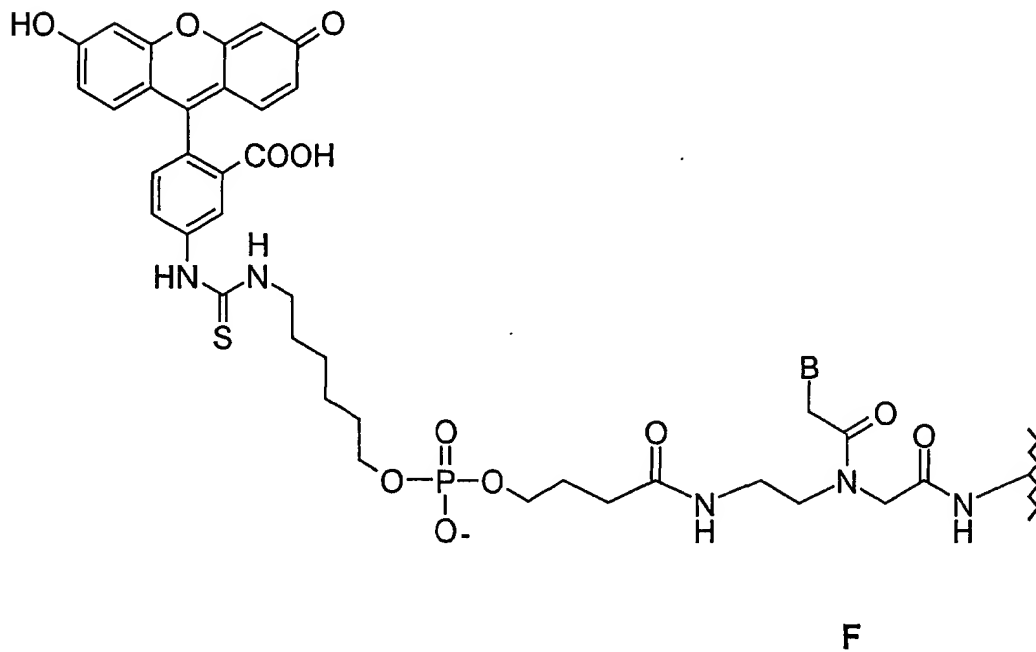
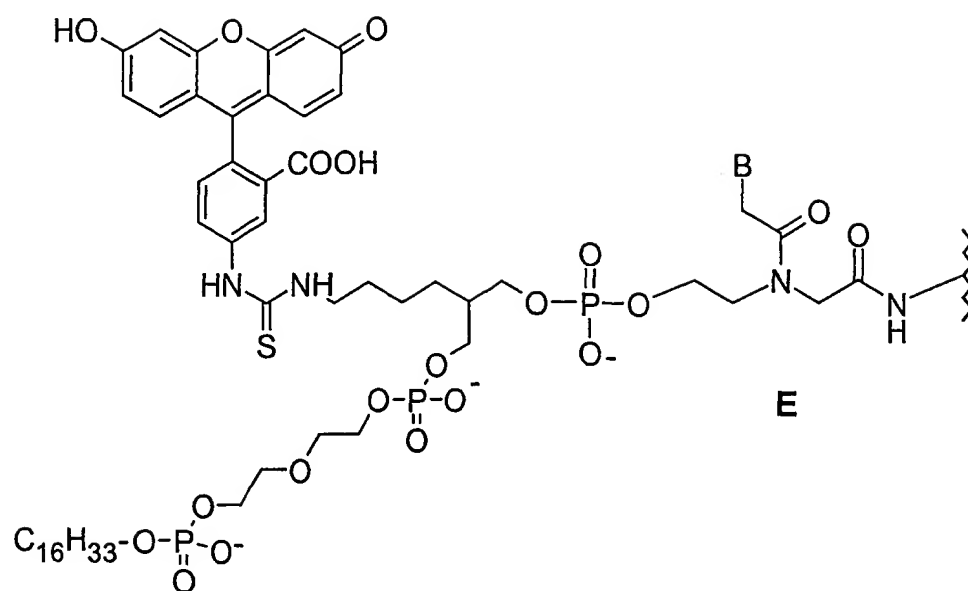
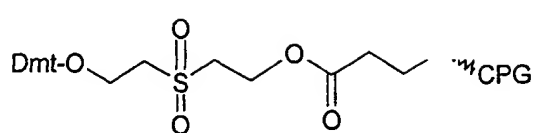
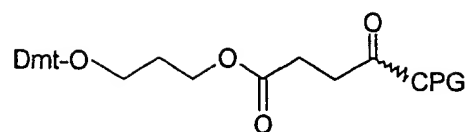


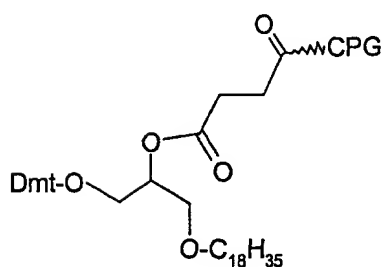
Fig. 6:



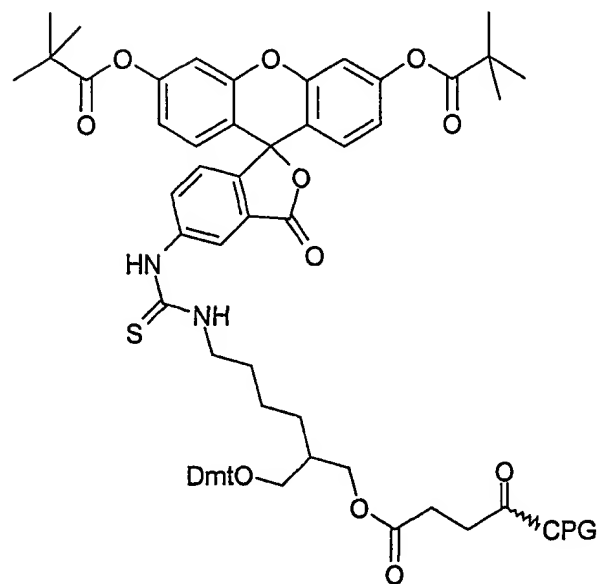
Bishydroxyethylsulfonyl Träger 1



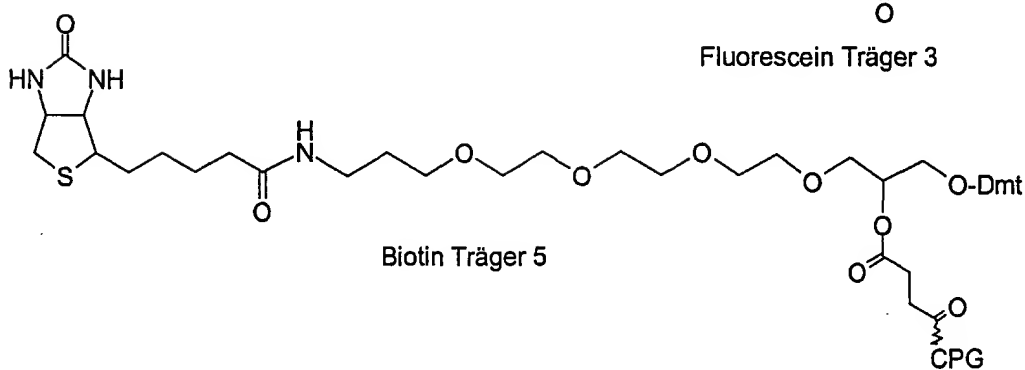
3'-Spacer-C3 Träger 2



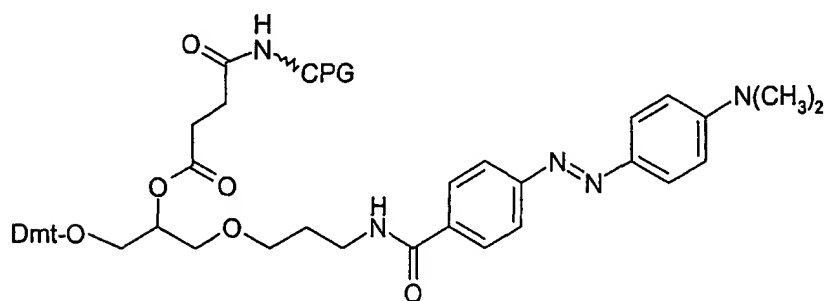
3'-Batyl Träger 4



Fluorescein Träger 3



Biotin Träger 5



DABCYL Träger 6

Fig. 7:

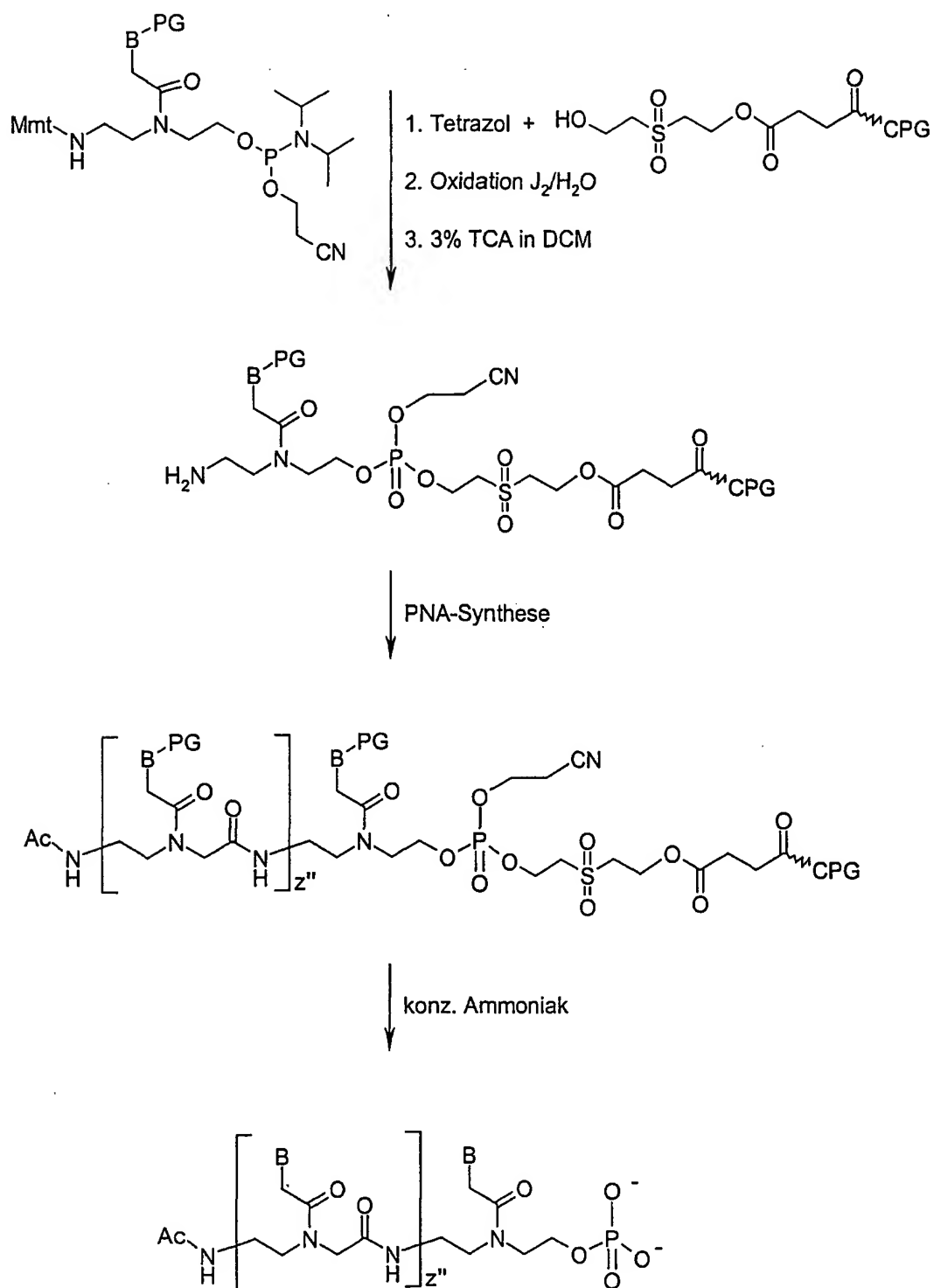


Fig. 8:

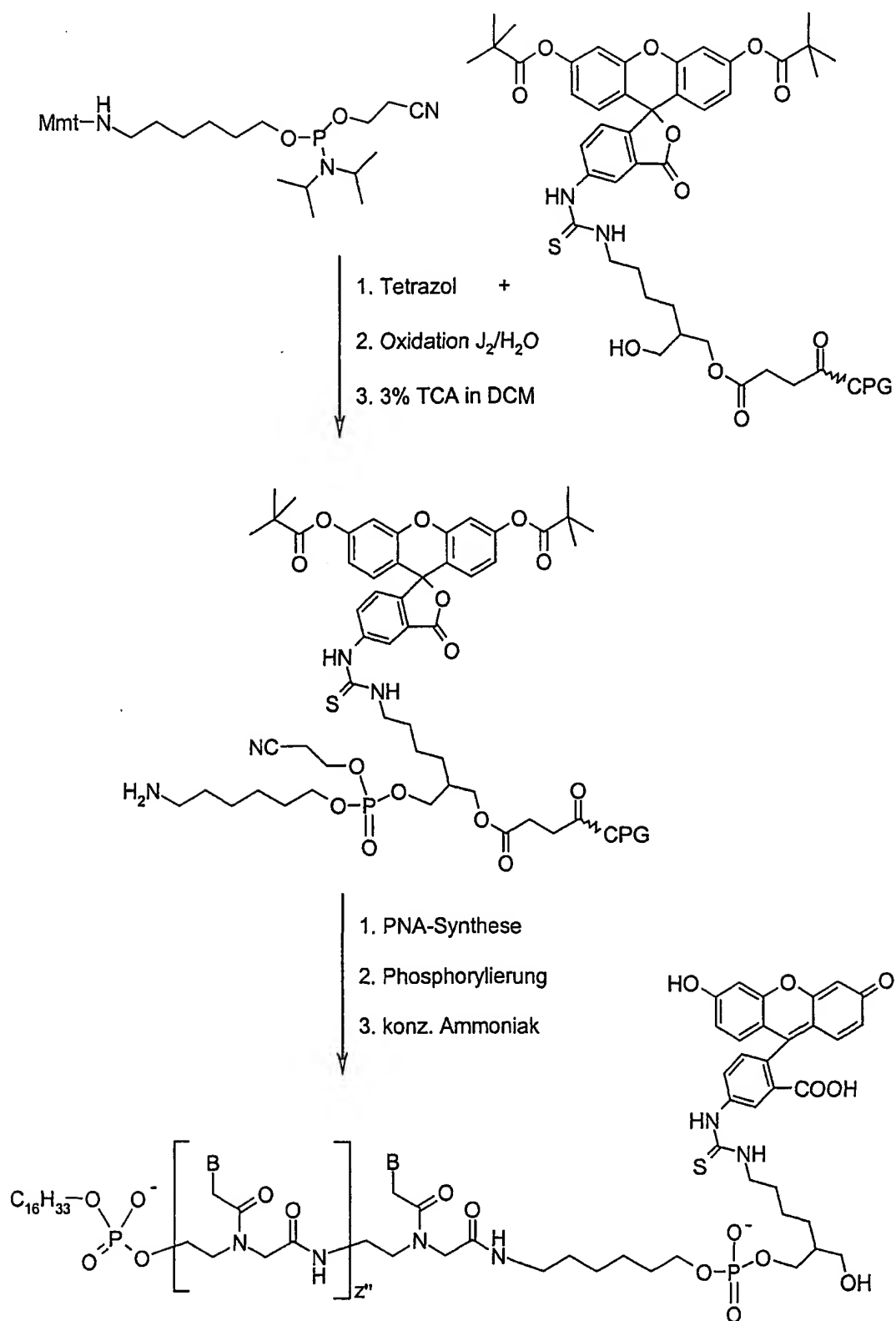
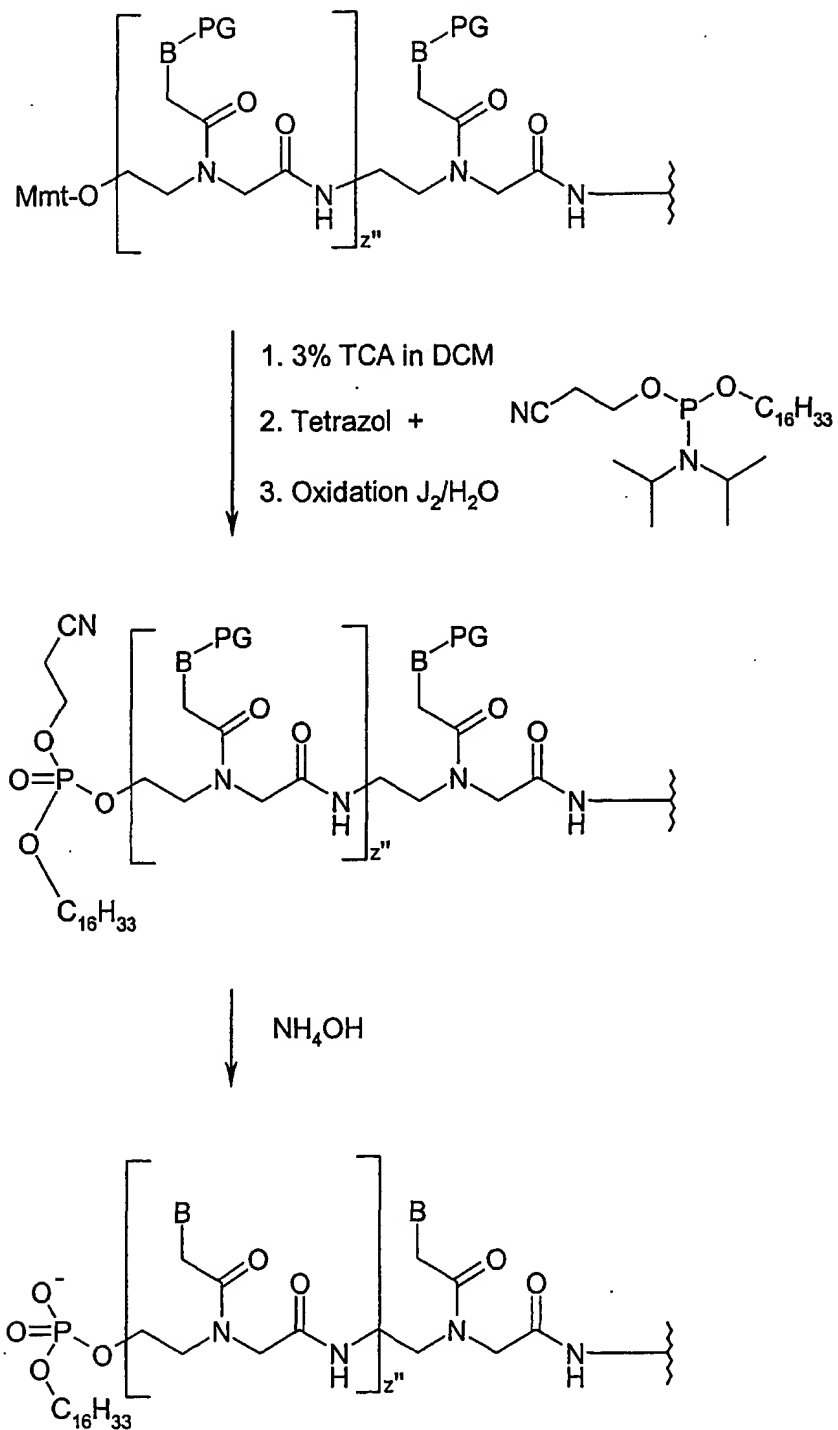


Fig. 9:



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

<120> Polyamidnukleinsäure-Derivate, Mittel und Verfahren zu
ihrer Herstellung

<130> AVE D-2000/A023

<140>

<141>

<150> 10019135.5

<151> 2000-04-18

<160> 53

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(21)

<400> 1

gcgtttgctc ttctttctgc g

21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(20)

<400> 2

acacccaatt ctgaaaatgg

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(20)

<400> 3

aggtccctgt tcgggcgcca

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(20)

<400> 4

gcggggctcc atgggggtcg

20

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(15)

<400> 5

cagctgcaac ccagc

15

<210> 6

<211> 11

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(11)

<400> 6

tattccgtca t

11

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(22)

<400> 7

ttccgtcatc gtcctcagg gg

22

<210> 8

<211> 15

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(15)

<400> 8

ggctgccatg gtccc

15

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(21)

<400> 9

ggctgctgga gcggggcaca c

21

<210> 10

<211> 15

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(15)

<400> 10

aacgttgagg ggcat

15

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(18)

<400> 11

gtgccgggggt cttcgggc

18

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(17)

<400> 12

cgagaacatc atcgtgg

17

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(21)

<400> 13

ggagaacatc atggtcgaaa g

21

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)..(22)

<400> 14
cccgagaaca tcatggtcga ag

22

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)..(20)

<400> 15
ggggaaagcc cggcaagggg

20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)..(20)

<400> 16

cacccgcctt ggcctccac

20

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(18)

<400> 17

gggactccgg cgcagcgc

18

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(20)

<400> 18

ggcaaacttt cttttcctcc

20

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(19)

<400> 19

gggaaggagg aggatgagg

19

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(21)

<400> 20

ggcagtcatc cagcttcgga g

21

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(18)

<400> 21

tctcccagcg tgcgccat

18

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(19)

<400> 22

gcgctgatag acatccatg

19

<210> 23

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(12)

<400> 23

ggaggcccgga cc

12

<210> 24

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(12)

<400> 24

ggtttcggag gc

12

<210> 25

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(12)

<400> 25

tggtggaggt ag

12

<210> 26

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(12)

<400> 26

gcatgggtgga gg

12

<210> 27

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(12)

<400> 27

ttggcatggt gg

12

<210> 28

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(12)

<400> 28

gcctgggacc ac

12

<210> 29

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(12)

<400> 29

cagcctggga cc

12

<210> 30

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(12)

<400> 30

tgcagcctgg ga

12

<210> 31
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)..(12)

<400> 31
gtgcagcctg gg 12

<210> 32
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)..(12)

<400> 32
ggtgcagcct gg 12

<210> 33
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)..(12)

<400> 33

atgggtgcag cc

12

<210> 34

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(12)

<400> 34

ggcttgaaga tg

12

<210> 35

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(12)

<400> 35

gcagcccccg ca

12

<210> 36

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(12)

<400> 36

gcagcagccc cc

12

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(20)

<400> 37

tcccgcctgt gacatgcatt

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(20)

<400> 38

gttctcgctg gtgagtttca

20

<210> 39

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(18)

<400> 39

gcgtgcctcc tcaactggc

18

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(18)

<400> 40

gcagtaagca tccatatc

18

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(20)

<400> 41

gccaagctg gcatccgtca

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1) .. (20)

<400> 42

ccccccaccac ttcccctctc

20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1) .. (20)

<400> 43

ctccccacc acttcccctc

20

<210> 44

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1) .. (19)

<400> 44

gctgggagcc atagcgagg

19

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(21)

<400> 45

actgctgcct cttgtctcag g

21

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(22)

<400> 46

caatcaatga cttcaagagt tc

22

<210> 47

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(18)

<400> 47

gcggcggaaa agccatcg

18

<210> 48
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)..(18)

<400> 48
gtgtcgggggt ctccgggc

18

<210> 49
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)..(15)

<400> 49
cacgttgagg ggcac

15

<210> 50
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)..(18)

<400> 50

gtcttccata gttactca

18

<210> 51

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(18)

<400> 51

gatcaggcgt gcctcaaa

18

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(21)

<400> 52

gatggagggc ggcatggcgg g

21

<210> 53

<211> 11

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotide

WO 01/79216

PCT/EP01/04030

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(11)

<400> 53

tattccgtca t

11

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Oktober 2001 (25.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/79216 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/00.
C12Q 1/68, C07K 9/40

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/04030

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. April 2001 (07.04.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 19 135.5 18. April 2000 (18.04.2000) DE

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND
GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt
(DE).

(72) Erfinder: UHLMANN, Eugen; Zum Talblick 31, 61479
Glashütten (DE). BREIPOHL, Gerhard; Geisenheimer
Strasse 95, 60529 Frankfurt (DE). WILL, David, William;
Kirchstrasse 21, 65830 Kriftel (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR.

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 28. Februar 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: POLYAMIDE NUCLEIC ACID DERIVATIVES. AGENTS AND METHODS FOR PRODUCING THEM

(54) Bezeichnung: POLYAMIDNUKLEINSÄURE-DERIVATE, MITTEL UND VERFAHREN ZUR IHRER HERSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to PNA derivatives that carry one or more phosphoryl groups at the C terminus or at the C and N terminus of the PNA backbone, said phosphoryl groups optionally carrying one or more marker groups, or groups for cross-linking, or groups that promote the intracellular uptake, or groups that improve the binding affinity of the PNA derivative to nucleic acids. The invention further relates to a method for producing the above PNA derivatives and to the use thereof as a medicament or diagnostic agent.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind PNA-Derivate, die am C-Terminus oder C- und N-Terminus des PNA-Rückgrates einen oder mehrere Phosphoryl-Reste tragen, die gegebenenfalls eine oder mehrere Markergruppen, oder Gruppen zur Quervernetzung, oder Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, oder Gruppen, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigern, tragen. Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung der oben genannten PNA-Derivate und ihre Anwendung als Arzneimittel oder Diagnostikum.

WO 01/79216 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No
PCT/EP 01/04030

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/00 C12Q1/68 C07F9/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12Q C07F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 874 553 A (HOECHST AG) 23 February 1999 (1999-02-23) the whole document ---	1-44
X	EP 0 672 677 A (HOECHST AG) 20 September 1995 (1995-09-20) the whole document ---	1-44
X	WO 99 37670 A (BOSTON PROBES) 29 July 1999 (1999-07-29) the whole document ---	1-44
X	WO 99 33867 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 8 July 1999 (1999-07-08) the whole document ---	1-44
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 November 2001

Date of mailing of the international search report

29/11/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. .onal Application No

PCT/EP 01/04030

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 195 08 923 A (HOECHST AG) 19 September 1996 (1996-09-19) the whole document ----	1-44
A	DE 196 40 974 A (BAYER AG) 16 April 1998 (1998-04-16) the whole document ----	1-44
A	WO 96 11205 A (ISIS) 18 April 1996 (1996-04-18) the whole document -----	1-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No

PCT/EP 01/04030

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5874553	A	23-02-1999	DE 19508923 A1	19-09-1996
			DE 19543865 A1	05-06-1997
			AT 206131 T	15-10-2001
			AU 706470 B2	17-06-1999
			AU 4802896 A	26-09-1996
			BR 9600993 A	30-12-1997
			CA 2171589 A1	14-09-1996
			CN 1138588 A ,B	25-12-1996
			CZ 9600743 A3	16-10-1996
			DE 59607750 D1	31-10-2001
			EP 0739898 A2	30-10-1996
			HU 9600647 A2	28-05-1997
			JP 8259579 A	08-10-1996
			NO 961006 A	16-09-1996
			NZ 286150 A	28-07-1998
			PL 313207 A1	16-09-1996
			US 6127346 A	03-10-2000
			ZA 9601986 A	21-11-1996
EP 672677	A	20-09-1995	DE 4408528 A1	28-09-1995
			AU 698210 B2	29-10-1998
			AU 1479895 A	21-09-1995
			CA 2144475 A1	15-09-1995
			CN 1112126 A	22-11-1995
			EP 1113021 A2	04-07-2001
			EP 0672677 A2	20-09-1995
			FI 951132 A	15-09-1995
			JP 7278179 A	24-10-1995
			NO 950955 A	15-09-1995
WO 9937670	A	29-07-1999	AU 2459199 A	09-08-1999
			EP 1054893 A1	29-11-2000
			WO 9937670 A1	29-07-1999
WO 9933867	A	08-07-1999	DE 19757516 A1	24-06-1999
			WO 9933867 A2	08-07-1999
			EP 0996631 A1	03-05-2000
DE 19508923	A	19-09-1996	DE 19508923 A1	19-09-1996
			AT 206131 T	15-10-2001
			AU 706470 B2	17-06-1999
			AU 4802896 A	26-09-1996
			BR 9600993 A	30-12-1997
			CA 2171589 A1	14-09-1996
			CN 1138588 A ,B	25-12-1996
			CZ 9600743 A3	16-10-1996
			DE 59607750 D1	31-10-2001
			EP 0739898 A2	30-10-1996
			HU 9600647 A2	28-05-1997
			JP 8259579 A	08-10-1996
			NO 961006 A	16-09-1996
			NZ 286150 A	28-07-1998
			PL 313207 A1	16-09-1996
			US 6127346 A	03-10-2000
			US 5874553 A	23-02-1999
			ZA 9601986 A	21-11-1996
DE 19640974	A	16-04-1998	DE 19640974 A1	16-04-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. J. Application No

PCT/EP 01/04030

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19640974 A		CA 2217377 A1 EP 0839828 A1 JP 10114788 A	04-04-1998 06-05-1998 06-05-1998
WO 9611205 A	18-04-1996	AU 3999495 A EP 0804456 A1 JP 10503524 T WO 9611205 A1	02-05-1996 05-11-1997 31-03-1998 18-04-1996

Inter. 9nales Aktenzeichen

PCT/EP 01/04030

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/00 C12Q1/68 C07F9/40

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K C12Q C07F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 874 553 A (HOECHST AG) 23. Februar 1999 (1999-02-23) das ganze Dokument ---	1-44
X	EP 0 672 677 A (HOECHST AG) 20. September 1995 (1995-09-20) das ganze Dokument ---	1-44
X	WO 99 37670 A (BOSTON PROBES) 29. Juli 1999 (1999-07-29) das ganze Dokument ---	1-44
X	WO 99 33867 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 8. Juli 1999 (1999-07-08) das ganze Dokument ---	1-44

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

'8' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. November 2001

Absenderdatum des internationalen Rechercheberichts

29/11/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Masturzo, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. .ionales Aktenzeichen

PCT/EP 01/04030

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 195 08 923 A (HOECHST AG) 19. September 1996 (1996-09-19) das ganze Dokument ---	1-44
A	DE 196 40 974 A (BAYER AG) 16. April 1998 (1998-04-16) das ganze Dokument ---	1-44
A	WO 96 11205 A (ISIS) 18. April 1996 (1996-04-18) das ganze Dokument -----	1-44

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/04030

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5874553	A	23-02-1999	DE 19508923 A1	19-09-1996
			DE 19543865 A1	05-06-1997
			AT 206131 T	15-10-2001
			AU 706470 B2	17-06-1999
			AU 4802896 A	26-09-1996
			BR 9600993 A	30-12-1997
			CA 2171589 A1	14-09-1996
			CN 1138588 A ,B	25-12-1996
			CZ 9600743 A3	16-10-1996
			DE 59607750 D1	31-10-2001
			EP 0739898 A2	30-10-1996
			HU 9600647 A2	28-05-1997
			JP 8259579 A	08-10-1996
			NO 961006 A	16-09-1996
			NZ 286150 A	28-07-1998
			PL 313207 A1	16-09-1996
			US 6127346 A	03-10-2000
			ZA 9601986 A	21-11-1996
EP 672677	A	20-09-1995	DE 4408528 A1	28-09-1995
			AU 698210 B2	29-10-1998
			AU 1479895 A	21-09-1995
			CA 2144475 A1	15-09-1995
			CN 1112126 A	22-11-1995
			EP 1113021 A2	04-07-2001
			EP 0672677 A2	20-09-1995
			FI 951132 A	15-09-1995
			JP 7278179 A	24-10-1995
			NO 950955 A	15-09-1995
WO 9937670	A	29-07-1999	AU 2459199 A	09-08-1999
			EP 1054893 A1	29-11-2000
			WO 9937670 A1	29-07-1999
WO 9933867	A	08-07-1999	DE 19757516 A1	24-06-1999
			WO 9933867 A2	08-07-1999
			EP 0996631 A1	03-05-2000
DE 19508923	A	19-09-1996	DE 19508923 A1	19-09-1996
			AT 206131 T	15-10-2001
			AU 706470 B2	17-06-1999
			AU 4802896 A	26-09-1996
			BR 9600993 A	30-12-1997
			CA 2171589 A1	14-09-1996
			CN 1138588 A ,B	25-12-1996
			CZ 9600743 A3	16-10-1996
			DE 59607750 D1	31-10-2001
			EP 0739898 A2	30-10-1996
			HU 9600647 A2	28-05-1997
			JP 8259579 A	08-10-1996
			NO 961006 A	16-09-1996
			NZ 286150 A	28-07-1998
			PL 313207 A1	16-09-1996
			US 6127346 A	03-10-2000
			US 5874553 A	23-02-1999
			ZA 9601986 A	21-11-1996
DE 19640974	A	16-04-1998	DE 19640974 A1	16-04-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/04030

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19640974 A		CA 2217377 A1	04-04-1998
		EP 0839828 A1	06-05-1998
		JP 10114788 A	06-05-1998
WO 9611205 A	18-04-1996	AU 3999495 A	02-05-1996
		EP 0804456 A1	05-11-1997
		JP 10503524 T	31-03-1998
		WO 9611205 A1	18-04-1996